

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO OCHOA

**IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS DIANAS FUNCIONALES DE  
LAS QUINASAS DE RECEPTORES ACOPLADOS A  
PROTEÍNAS G (GRKs).**

MARÍA HELENA HOLGUÍN ASENSIO



Memoria presentada por la licenciada  
MARÍA HELENA HOLGUÍN ASENSIO

Para aspirar al grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS

Directores de esta tesis:

Dr. Federico Mayor Menéndez  
Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular  
Departamento de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid

Dra. Ana Ruiz Gómez  
Profesora Titular de Bioquímica y Biología Molecular  
Departamento de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid

MADRID, 2009





EL PRESENTE TRABAJO HA SIDO REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y EN EL CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO OCHOA (CSIC-UAM) DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID, CON LA AYUDA DE UNA BECA PREDOCTORAL FPI DEL FONDO DE INVESTIGACIÓN DE LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE MADRID.



A mis compañeros



A lo largo de todos estos años han pasado por mi vida muchas personas que, a su modo, han ayudado a que esta tesis haya sido posible. A todos ellos quiero mostrarles mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar a Fede, por darme la oportunidad de realizar mi tesis en su laboratorio. Gracias por tus consejos y por intentar hacernos ver la ciencia con ilusión y sin prejuicios.

A mi “jefa” Ana, por haberme enseñado tanto y por mantener la ilusión a pesar de las dificultades encontradas por el camino. Siempre has estado ahí para resolver mis dudas, ayudarme y aguantar mis momentos de flaqueza, quizás demasiado frecuentes en esta última etapa. Creo que hemos formado un gran equipo.

Un agradecimiento muy, muy especial a Espe, sin ti esta tesis no hubiese sido posible. A ti te debo mucho de lo que sé. Lo que has hecho por mí no lo hubiera hecho cualquiera.

A los laboratorios de José Ramón Naranjo (CNB) y de José Félix De Celis (CBMSO) porque esta tesis es en parte suya. Y en especial a Cristina Molnar, gracias por tu esfuerzo, por todo lo que me has enseñado y por estar siempre disponible para resolver mis dudas.

Al servicio de Proteómica de la Red Cardiovascular por el trabajo realizado en la identificación del sitio de fosforilación.

A todas las personas que forman parte de los servicios del CBMSO. Gracias por la ayuda técnica.

A mis compañeros de laboratorio, a los que me siento en la necesidad de dedicarles esta tesis, porque me han acompañado durante todos estos años haciendo que mi estancia en el laboratorio haya sido estupenda. Gracias por vuestra ayuda, consejos y, sobre todo, alegría.

A mis “niñas” Alicia, Carlota, María, Ivette y Vero. Nos hemos hecho inseparables. Ya sólo por vosotras estos años han merecido la pena. Gracias por ser como sois.

Al pequeño Guzmán (“Bochán” para los amigos), por ser único. Gracias por tu música, tus historias y, sobre todo, tu alegría.

A Cati por brindarnos siempre su mejor sonrisa. Voy a echar mucho de menos nuestras conversaciones mañaneras y tu dosis de optimismo. Eres una amiga.

A Susana por su inestimable ayuda. Gracias por tu esfuerzo y trabajo para conseguir que las cosas salgan adelante.

A Nila por estar siempre dispuesta a ayudar, a Cristina por su amabilidad y comprensión, a Raúl, Pedro, Paula, Alejandro y Ana por su compañía, sus charlas y todos los momentos compartidos. A Juanjo por ayudarme en todo lo que ha podido. A Laura porque nos ha conquistado con su risa.

A Mada por su inestimable ayuda.

A mis peques Rubén, Sofi, Miguel y Marcos porque también son parte del “Labo” y me han enseñado sobre otros aspectos de la vida.

A Grego y a M<sup>a</sup> José que nos traen un soplo de alegría cada tarde. A Carmen Punzón por su simpatía.

A mis “emigrantes”, Alberto y Elvira. Vosotros tenéis todo lo que se puede pedir de un amigo. Gracias por todos los momentos que hemos vivido juntos. Os echo tanto de menos...

A Sandra y a Antonio por acogerme como a una más cuando entré y seguir demostrándome su cariño durante todos estos años.

A Marta, “la super hermana”. Gracias por tu cariño, tu alegría y tus consejos. Te has convertido en una “Chirly” más.

A los del 340 y a Aitor, Laura, Juanfra, Alfredo e Ismael (“Chirly”). Gracias por los buenos momentos y por vuestro apoyo.

A Belén, Fernando, Carmina y Paco por hacer de los ratos en la cafetería un momento de desconexión y relajo.

A la pequeña Gema por su bondad. Gracias por saber escuchar y por tu apoyo incondicional.

A Ana, Sandra y Elisa por haber estado toda la vida a mi lado. Sé que siempre podré contar con vosotras.

A mis amigos Bea, Esther, Antonio, Nuria, Nacho, Darío, Chicharra, Diana, Iván, Edu y Alfonso. ¿Qué haría yo sin vosotros? Sois los mejores.

A mis padres porque son esenciales en mi vida. Gracias por vuestro ejemplo y confianza. Gracias por haberme hecho tal y como soy. Sois mi referencia.

A mi hermano porque, aunque tenemos nuestros más y nuestros menos, somos inseparables. La vida que hemos compartido no la cambiaría por nada del mundo. A Dimas porque todo lo que tiene de grande lo tiene de majo.

A mi abuela porque, aunque no entiende por qué “sigo estudiando”, siempre me apoyará. Gracias por tu cariño. No hay nadie como tú.

Al resto de mi familia porque creo que no habría podido tener una mejor.

Y por supuesto, a Pablo porque la vida sin él no tiene sentido. Lo mejor que me ha pasado en la vida es haberte conocido. Gracias por estar siempre ahí, en los buenos y en los malos momentos, por ser tan bueno, por tu buen humor, por tu alegría y, simplemente, por ser como eres. Te quiero.

“Lo que sabemos es una gota de agua, lo que ignoramos es el océano”.  
Newton, Sir Isaac.





# ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	19
SUMMARY .....	23
INTRODUCCIÓN .....	25
1.- GRKs (G protein-coupled Receptor Kinases) .....	28
1.1.- La familia de las GRKs. Clasificación, estructura y especificidad de sustrato .....	29
1.1.1.- Clasificación .....	29
1.1.2.- Estructura .....	29
1.1.3.- Especificidad de sustrato .....	30
1.2.- Papeles funcionales de las GRKs .....	30
1.2.1.- Fosforilación de sustratos no GPCRs .....	31
1.2.2.- Regulación de otras proteínas independiente de fosforilación .....	32
1.3.- Regulación de la actividad y localización subcelular de las GRKs .....	32
1.3.1.- Regulación de GRKs por subunidades Gβγ y lípidos .....	32
1.3.2.- Interacción con GPCRs y proteínas Gα .....	34
1.3.3.- Regulación de GRKs por proteínas de unión a calcio .....	34
1.3.4.- Regulación por modulación de la localización subcelular .....	35
1.3.5.- Regulación por fosforilación por otras quinasas .....	35
1.3.5.1.- Fosforilación por quinasas de segundos mensajeros PKC y PKA .	35
1.3.5.2.- Fosforilación por c-Src y MAPK .....	36
1.3.6.- Regulación por nitrosilación .....	36
1.4.- Regulación de los niveles de GRKs .....	37
1.4.1.- Regulación de las GRKs a nivel transcripcional .....	37
1.4.2.- Regulación traduccional de la expresión de las GRKs .....	37
1.4.3.- Regulación post-traduccional: degradación de las GRKs .....	37
1.5.- GRKs en situaciones fisiopatológicas .....	38
2.- CALSENILINA/DREAM/KCHIP3: PROTEÍNA SENSORA DE CALCIO .....	39
2.1.- Identificación .....	40
2.2.- Estructura .....	40
2.3.- Funciones celulares de la proteína calsenilina/DREAM/KCHIP3 .....	40
2.3.1.- Calsenilina .....	40
2.3.2.- DREAM .....	42
2.3.3.- KCHIP3 .....	43
3.- PRESENILINAS .....	43
3.1.- Estructura del complejo γ-secretasa .....	44
3.1.1.- Presenilinas, el sitio activo .....	44
3.1.2.- Nicastrina, el receptor del sustrato .....	45
3.1.3.- Aph-1, el estabilizador .....	46
3.1.4.- Pen-2, el eje .....	46
3.1.5.- Otras proteínas .....	46
3.2.- Funciones de las presenilinas .....	47

3.2.1.- Actividad $\gamma$ -secretasa .....	47
3.2.1.1.- Modulación de la actividad $\gamma$ -secretasa .....	48
3.2.2.- Actividad de presenilina independiente del complejo $\gamma$ -secretasa .....	49
4.- RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE HEDGEHOG (HH) .....	50
4.1.- Componentes de la ruta de señalización de Hh .....	50
4.2.- Mecanismo de la ruta de señalización de Hh .....	50
4.3.- Smoothed (Smo) como un miembro de la familia de GPCRs .....	52
5.- <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> , ORGANISMO MODELO PARA ESTUDIAR EL DESARROLLO .....	53
5.1.- Ciclo vital .....	53
5.2.- El disco imaginal de ala como modelo experimental .....	54
5.2.1.- Especificidad del eje Dorso-Ventral .....	55
5.2.2.- Especificidad del eje Antero-Posterior .....	56
OBJETIVOS .....	57
MATERIALES Y MÉTODOS .....	61
1.- REACTIVOS .....	63
2.- MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....	63
2.1.- Amplificación de DNA (PCR) .....	63
2.2.- Amplificación de DNA a partir de colonias bacterianas (PCR de colonias) .....	63
2.3.- Digestiones enzimáticas .....	64
2.4.- Ligación .....	64
2.5.- Mutagénesis dirigida .....	64
2.6.- Extracción de RNA .....	65
2.7.- Reacción de retro-transcripción (RT) .....	65
2.8.- RT-PCR cuantitativa .....	65
2.9.- Generación de RNA de doble cadena .....	65
2.10.- Generación de sondas para la hibridación "in situ" .....	66
2.11.- Clonajes realizados .....	66
2.11.1.- Adenovirus shRNA de GRK2 .....	66
2.11.2.- pUAS-Gprk2i .....	68
2.11.3.- pGEX-2T-Gprk2 <sub>Nt</sub> .....	70
2.11.4.- pBS-EST LD42147 de Gprk2 .....	70
2.11.5.- pUAs-Gprk2 .....	70
3.- CULTIVOS CELULARES .....	73
3.1.- Líneas celulares establecidas .....	73
3.2.- Líneas celulares estables .....	74
3.3.- Plásmidos y construcciones utilizados .....	75
3.3.1.- Plásmidos utilizados .....	75
3.3.2.- Construcciones generadas .....	76

3.4.- Transfecciones .....	76
3.4.1.- Transfecciones transitorias .....	76
3.4.2.- Transfecciones estables .....	77
3.5.- Generación del adenovirus “stock” .....	77
3.6.- Infección de células con adenovirus .....	77
3.7.- Titulación viral .....	77
3.8.- Tratamientos celulares .....	78
3.8.1.- Estimulación con isoproterenol .....	78
3.8.2.- Tratamiento con el inhibidor $\gamma$ -secretasa. (L-685,458) .....	79
3.8.3.- Tratamiento con el inhibidor del proteasoma MG132 .....	79
3.8.4.- Tratamiento con RNA de doble cadena .....	79
4.- OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES DE RATÓN .....	79
5.- ENSAYO DE ACTIVIDAD $\gamma$ -SECRETASA: GENERACIÓN DEL FRAGMENTO DOMINIO IN- TRACITOPLASMÁTICO DE APP (AICD) .....	79
6.- GENERACIÓN DE LA LÍNEA GERMINAL TRANSGÉNICA UAS-GPRK2 .....	79
7.- LÍNEAS DE <i>DROSOPHILA</i> .....	80
8.- GENERACIÓN DE LOS CLONES POR RECOMBINACIÓN FLP-FLP .....	81
9.- PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS PURIFICADOS .....	81
9.1.- Proteínas de fusión a GST .....	81
9.2.- Generación de proteínas recombinantes por baculovirus .....	82
9.2.1.- GRK2, GRK5 y GRK6 .....	82
9.3.- Rodopsina .....	83
10.- GENERACIÓN DEL ANTICUERPO ANTI GPRK2 N-TERMINAL .....	83
11.- ELECTROFORESIS .....	83
11.1.- Electroforesis .....	83
11.1.1.- Geles unidimensionales .....	83
11.1.2.- Geles bidimensionales .....	83
11.1.3.- Geles de bicina .....	84
11.2.- Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa-TAE .....	85
12.- MARCAJE METABÓLICO .....	85
13.- ENSAYOS DE FOSFORILACIÓN .....	85
13.1.- Fosforilación de proteínas recombinantes .....	85
13.2.- Desfosforilación de proteínas recombinantes .....	85
14.- IDENTIFICACIÓN DEL SITIO DE FOSFORILACIÓN MEDIANTE “FRAGMENTACIÓN DEL PÉPTIDO MS/MS” .....	86

15.- INMUNO-PROTOCOLOS .....	86
15.1.- Inmunodetección tras electroforesis .....	86
15.2.- Inmunoprecipitación .....	87
15.3.- Inmunofluorescencia .....	87
15.3.1.- Inmunofluorescencia de células .....	87
15.3.2.- Inmunohistoquímica de discos imaginales de <i>Drosophila</i> .....	88
15.3.3.- Inmunohistoquímica de embriones de <i>Drosophila</i> .....	88
15.4.- Anticuerpos utilizados .....	88
16.- ENSAYOS DE INTERACCIÓN “IN VITRO” .....	90
17.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD LUCIFERASA .....	90
17.1.- Medida de la actividad luciferasa .....	90
17.2.- Medida $\beta$ -gal .....	90
18.- MEDIDA DE PROTEÍNAS .....	90
19.- TRATAMIENTO MATEMÁTICO Y ESTADÍSTICO DE LOS DATOS .....	91
RESULTADOS .....	93
1.- FOSFORILACIÓN DE DREAM POR MIEMBROS DE LA FAMILIA DE QUINASAS DE RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GRKs): REGULACIÓN DEL TRÁFICO DE MEMBRANA DE LOS CANALES DE POTASIO Kv4.2 .....	95
1.1.- DREAM es sustrato de GRK2 y de GRK6 .....	95
1.2.- Caracterización de la fosforilación de DREAM por GRK2 .....	97
1.3.- Identificación del sitio de fosforilación de DREAM por GRK2 .....	98
1.4.- La fosforilación de DREAM por GRK2 no afecta a su actividad como represor transcripcional pero sí regula la función de los canales de potasio Kv4 .....	100
1.5.- La fosforilación de DREAM por GRK2 regula el tráfico de los canales Kv4 a la membrana plasmática .....	101
1.6.- Calcineurina regula el tráfico de Kv4 mediado por DREAM .....	102
2.- LA FOSFORILACIÓN DE PRESENILINA 1 (PS1) POR GRK2 MODULA SU ESTABILIDAD Y SU ACTIVIDAD EN EL COMPLEJO $\gamma$ -SECRETASA .....	104
2.1.- ¿Es presenilina un modulador de la fosforilación de DREAM por GRK2? .....	104
2.2.- Interacción “in vitro” e “in situ” entre PS1 y GRK2 .....	105
2.3.- Caracterización de la fosforilación de PS1 por GRK2 .....	108
2.4.- Fosforilación de PS1 por otras GRKs .....	110
2.5.- Modulación de la actividad de GRK2 por el dominio carboxilo terminal de PS1 .....	110
2.6.- La interacción entre PS1 y GRK2 es dependiente de agonista y de la internalización de GPCRs .....	111
2.7.- La fosforilación dependiente de MAPK y c-Src favorece la interacción con PS1 .....	113
2.8.- Repercusiones funcionales de la fosforilación de PS1 por GRK2.....	114
2.8.1.- La fosforilación de PS1 por GRK2 modula la vida media de PS1 .....	114

2.8.2.- Análisis de tejidos de ratones heterocigotos para la deficiencia de GRK2 revelan niveles alterados de PS1 .....	115
2.8.3.- Efecto de los niveles de GRK2 en la actividad $\gamma$ -secretasa de PS1 .....	116
2.8.4.- Membranas cerebrales de ratones heterocigotos para la deficiencia de GRK2 producen menores niveles del dominio intracitoplasmático (ICD) del APP..	118
2.9.- Identificación del sitio de fosforilación de PS1 por GRK2 .....	118
 3.- LA QUINASA REGULADORA DE RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPRK2) PARTICIPA EN LA SEÑAL DE HEDGEHOG EN <i>DROSOPHILA</i> .....	120
3.1.- Desarrollo de nuevas armas experimentales .....	121
3.1.1.- Generación de cDNA completo de Gprk2 .....	121
3.1.2.- Generación de anticuerpos policlonales frente a Gprk2 .....	121
Caracterización de los anticuerpos anti-Gprk2 <sub>Nt</sub> en ensayos de inmuno- marcado tras electroforesis .....	122
Caracterización de los anticuerpos anti-Gprk2 <sub>Nt</sub> mediante inmunofluo- rescencia .....	123
Caracterización de los anticuerpos anti-Gprk2 <sub>Nt</sub> mediante inmunohisto- química .....	124
3.2.- Regulación de la expresión de Gprk2 por la señal de Hh en el disco de ala .....	126
3.3.- Estudios de RNA interferente para Gprk2 revelan que la quinasa es necesaria en la ruta de señalización de Hh en el disco imaginal de ala .....	127
3.4.- Gprk2 es necesaria para la expresión de genes que dependen de Hh en el disco imaginal de ala .....	130
3.5.- Especificidad del RNA interferente de Gprk2: Generación de clones deficientes en la quinasa.....	131
3.6.- Expresión de la proteína Smoothed (Smo) en discos de ala mutantes para Gprk2.	131
3.7.- Relación funcional entre Smo y Gprk2 .....	133
3.8.- La expresión del cDNA de Gprk2 es capaz de rescatar el fenotipo inducido por Gprk2i .....	135
3.9.- Ruta de Hh/Smo en células S2 .....	135
 DISCUSIÓN .....	137
 1.- LA FOSFORILACIÓN DE DREAM MEDIADA POR GRK2 REGULA EL TRÁFICO DE MEM- BRANA DE LOS CANALES DE POTASIO Kv4.2 .....	139
 2.- GRK2 MODULA LA ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD DE PRESENILINA 1 (PS1) .....	143
 3.- LA QUINASA REGULADORA DE GPCRs GPRK2 PARTICIPA EN LA SEÑAL DE HEDGEHOG EN <i>DROSOPHILA</i> .....	149
 CONCLUSIONES .....	153
 BIBLIOGRAFÍA .....	157



**A:** Anterior  
**aa:** Aminoácidos  
**A $\beta$ :**  $\beta$ -amiloide  
**ADAM:** Proteína desintegrina metaloproteasa  
**Ad control:** Adenovirus control  
**Ad shRNA-GRK2:** Adenovirus sh RNA de GRK2  
**AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico  
**Ap:** Apterous  
**Aph-1:** Anterior pharynx defective-1  
**APP:** Proteína precursora del péptido  $\beta$ -amiloide  
**APS:** Persulfato amónico  
 **$\beta_1$ ,  $\beta_2$ -AR:** Receptores beta 1 y beta 2 adrenérgicos  
 **$\beta$ -arr:**  $\beta$ -arrestinas  
**ATP:** Adenosina trifosfato  
**BACE:**  $\beta$ -secretasa  
**Bs:** Blistered  
**BSA:** Albúmina de suero bovino  
**Caup:** Caupolican  
**N-cad-CTF2:** Fragmento C-terminal 2 de la caderina neuronal  
**CHX:** Cicloheximida  
**Ci:** Cubitus interruptus  
**CKI:** Caseína quinasa 1  
**Col:** Collier  
**Cos2:** Costal 2  
**CRD:** Dominio rico en cisteínas  
**CREB:** Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc  
**D:** Dorsal  
**Dbr:** Debra  
**DI:** Delta  
**DMEM:** Medio de Eagle modificado por Dulbecco  
**DMSO:** Dimetilsulfóxido  
**DNA:** Ácido desoxirribonucleico (c, codificante; g, genómico)  
**Dpp:** Decapentaplegic  
**DREAM:** Downstream Regulatory Element Antagonist Modulator  
**Dsp:** Dispatched  
**DTT:** Ditriotreitol  
**EDTA:** Ácido etilén-diamino-tetracético  
**EGTA:** Ácido etilenglicol-bis- $\beta$ -amino etil N, N' tetraacético  
**En:** Engrailed  
**ErbB:** Receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo tirosina quinasa  
**ERKs:** Quinasas reguladas por señales extracelulares  
**FBS:** Suero fetal bovino  
**Fng:** Fringe  
**Fu:** Fused  
**Fz:** Receptor frizzled  
**G $\alpha$ :** Subunidad alfa de las proteínas G

## ABREVIATURAS

---

**G $\beta\gamma$** : Subunidades beta-gamma de las proteínas G  
**Gly**: Glicina  
**GPCRs**: Receptores acoplados a proteínas G  
**Gprks**: Homólogos de GRKs en *Drosophila*  
**GRKs**: Quinasas de receptores acoplados a proteínas G  
**GSK-3 $\beta$** : Quinasa de glicógeno sintasa-3 $\beta$   
**GST**: Glutathion S-transferasa  
**HEPES**: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacinoetanosulfónico  
**Hh**: Hedgehog  
**ICD**: dominio intracelular  
**IP**: Inmunoprecipitación  
**Iso**: Isoproterenol (agonista de receptores adrenérgicos)  
**Iro**: Iroquois  
**JNKs**: Quinasas del extremo N-terminal de c-Jun  
**KChIPs**: Proteínas de interacción con canales de potasio  
**Kn**: Knot  
**K.O**: Knockout  
**Kv4.2**: Subunidad de canales de potasio dependientes de voltaje  
**MAPKs**: Quinasas activadas por mitógenos  
**MDM2**: Murine double minute 2  
**NCS**: Sensores neuronales de calcio  
**Nct**: Nicastrina  
**NFAT**: Factor nuclear de células T activadas  
**P**: Posterior  
**PAGE**: Electroforesis en gel de poliacrilamida  
**PBS**: Tampón fosfato salino  
**PCR**: Reacción en cadena de la polimerasa  
**P/D**: Próximo/Distal  
**Pen-2**: Presenilin enhancer 2  
**PH**: Dominio de homología a plectrina  
**PI3K**: Quinasa de 3'-fosfatidil inositol  
**PKA**: Proteína quinasa dependiente de AMPc  
**PKC**: Proteína quinasa C  
**PLC**: Fosfolipasa C  
**PMSF**: Fenil metilsulfonil fluoruro  
**PS1 y 2**: Presenilinas 1 y 2  
**PS-NTF**: Fragmento N-terminal de PS  
**PS-CTF**: Fragmento C-terminal de PS  
**Ptc**: Patched  
**RE**: Retículo endoplásmico  
**RGS**: Regulador de la señal de proteínas G  
**RH**: Dominio de homología a RGS  
**RIP**: Proteólisis intramembrana regulada  
**RNA**: Ácido ribonucleico (m, mensajero; i, interferente)  
**RT**: Retro-transcripción  
**SDS**: Dodecil sulfato sódico  
**Ser**: Serina



**Ser:** Serrate  
**Smo:** Smoothened invertebrados / vertebrados  
**c-Src:** Tirosina quinasa citosólica  
**STI:** Inhibidor de la tripsina de soja  
**SuFu:** Supresor de Fused  
**TAE:** Tris-acético EDTA  
**TE:** Tris EDTA  
**TEMED:** N, N, N', N'-tetrametil-etilén-diamina  
**Thr:** Treonina  
**TMD:** Dominio transmembrana  
**Tris:** Tris-hidroxi-metil-amino-metano  
**TACE:** Enzima convertidora del factor de necrosis tumoral alfa  
**V:** Ventral



G protein-coupled receptor kinases (GRKs) represent an important point of convergence of different signalling routes. GRKs were first reported to participate together with arrestins in the regulation of multiple G protein-coupled receptors (GPCR), a family of hundreds of membrane proteins of key physiological importance. More recent evidence indicates that GRKs (and in particular the ubiquitous GRK2 isoform) can also phosphorylate certain tyrosine kinase receptors and a growing number of non-GPCR substrates and interact with a variety of proteins involved in cell signaling, acting as agonist-regulated adaptor scaffolds, thus suggesting that these proteins could have diverse “effector” functions.

This work has been focused in the identification of new functional interactions of GRK proteins. First, we have characterized that DREAM/calnenilin/KChIP3 protein interacts and is phosphorylated by GRK2 at Ser-95. This phosphorylation did not modify the repressor activity of DREAM, but mimicking phosphorylation at this site impairs DREAM-mediated membrane expression of the Kv4.2 potassium channel without affecting channel tetramerization. In addition, inhibition of calcineurin, a phosphatase able to dephosphorylate DREAM protein that has been phosphorylated by GRK2 “in vitro”, also blocked DREAM-mediated Kv4.2 channel trafficking. Our results thus suggest that these dynamic posttranslational events regulate the activity of DREAM on Kv4.2 channel function.

We have also identified Presenilin 1 (PS1), a DREAM/calnenilin/KChIP3-interacting protein itself, as a novel GRK2 functional partner. PS1 interacts and is phosphorylated by GRK2 in a  $\beta_2$ -adrenergic receptor activation and internalization-dependent manner. GRK2/PS1 association is increased upon phosphorylation of GRK2 by c-Src and ERK. Phosphorylation of full-length PS1 by GRK2 promotes PS1 degradation by the proteasome pathway, whereas phosphorylation of the processed PS1 (NTF/CTF) enhances  $\gamma$ -secretase activity towards APP in a GRK2-activity and phosphorylated-state-dependent manner.

Finally, we have shown that Gprk2, a *Drosophila* member of the GRKs family, plays a key role in the Smo signal transduction pathway. Smo is a transmembrane protein with a heptahelical topology characteristic of G protein-coupled receptors. Despite such similarity, the mechanisms regulating Smo signaling are not fully understood. Using *Drosophila melanogaster* as an experimental model, we have shown that lowering Gprk2 levels in the wing disc reduces the expression of Smo targets and causes a phenotype reminiscent of loss of Smo function. We have found that Gprk2 function is required for transducing the Smo signal and that when Gprk2 levels are lowered, Smo still accumulates at the cell membrane, but its activation is reduced. Interestingly, the expression of Gprk2 in the wing disc is regulated in part by Smo, generating a positive feedback loop that maintains high Smo activity close to the anterior-posterior compartment boundary.

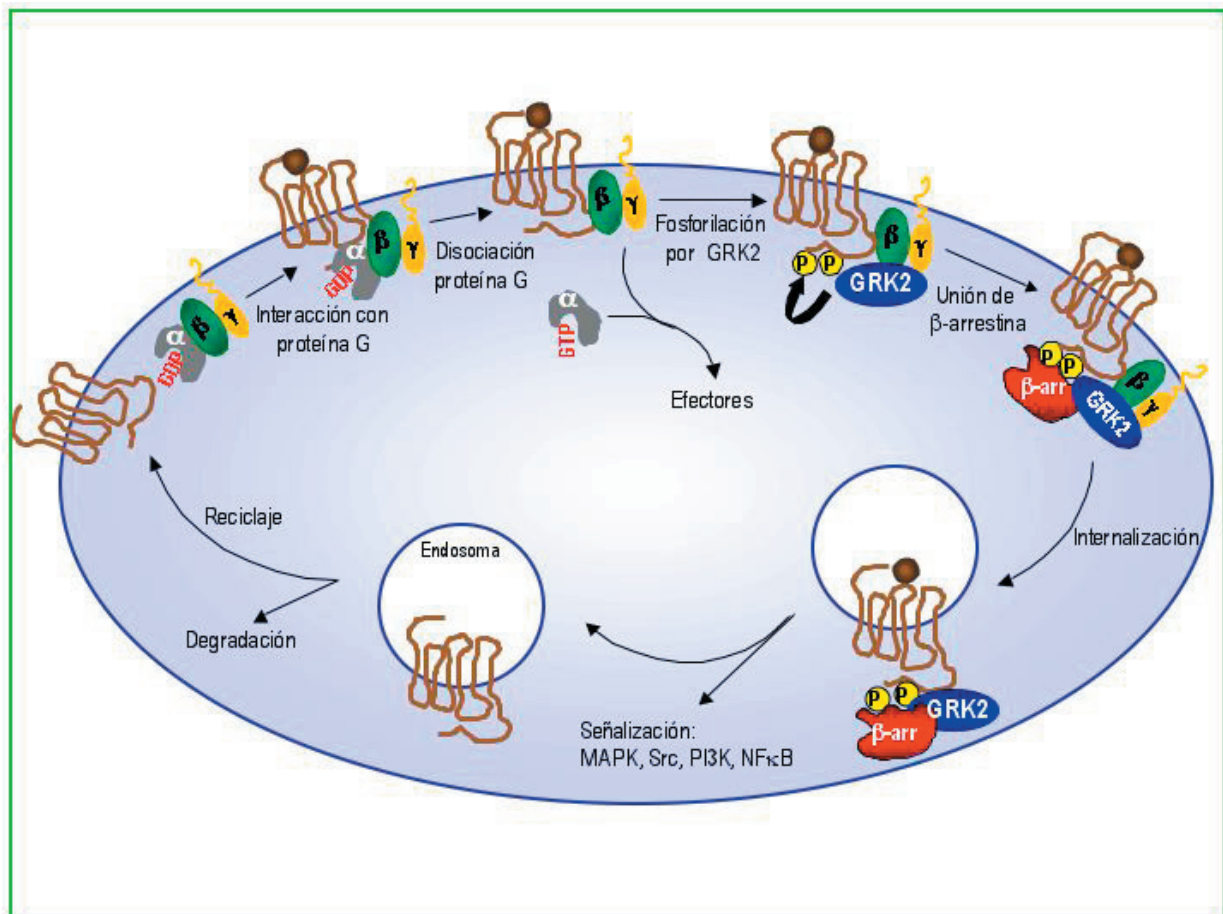


## INTRODUCCIÓN



Un organismo es un conjunto de átomos y moléculas que forman una estructura material muy compleja, organizada en células, que se relacionan entre sí y con el ambiente, de una forma ordenada, mediante sistemas de comunicación que coordinan funciones básicas de la vida como son la homeostasis, el crecimiento y la reproducción.

Entre los sistemas de detección de las condiciones ambientales sobresale una familia de receptores, ubicados en la membrana plasmática de las células, que se conocen como receptores acoplados a proteínas G (GPCR, del inglés: *G* protein-coupled receptors). Estos receptores, más de 800 en humanos, comparten rasgos estructurales característicos: son proteínas integrales que atraviesan siete veces la membrana plasmática y que presentan un extremo N-terminal extracelular y un extremo C-terminal intracelular (Baldwin, 1993), y controlan funciones fisiológicas principales como la neurotransmisión, la respuesta inmune, la contracción del músculo cardíaco y la regulación de la presión de la sangre, entre otras (Dorsam, 2007).



**FIGURA 1.- TRÁFICO DE LOS RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCRs).**

La activación de los receptores acoplados a proteínas G por un agonista provoca la disociación de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta\gamma$  de la proteína G, que actuarán sobre distintos efectores. El dímero  $G\beta\gamma$  libre recluta quinasas de receptores acoplados a proteínas G (como GRK2 o GRK3) al receptor para su fosforilación. Esto permite el reclutamiento al receptor de  $\beta$ -arrestina, que dirige al complejo receptor/ $\beta$ -arrestina a vesículas recubiertas de clatrina. El receptor es internalizado en endosomas ácidos y desfosforilado para regresar a la superficie celular, o bien ser degradado. Figura modificada de Pierce, 2002.

## INTRODUCCIÓN

La mayoría de los GPCRs se activan tras la unión de su ligando, el cual provoca una serie de cambios conformacionales en el receptor capaces de promover su interacción con proteínas G heterotriméricas, estimulando el intercambio de GDP por GTP, la disociación de las subunidades  $G\alpha$ -GTP y  $G\beta\gamma$  y, finalmente, la transmisión de la señal (**figura I 1**).

La capacidad de respuesta de los GPCRs está determinada por un balance altamente regulado entre señalización, desensibilización y resensibilización del receptor. La desensibilización de los receptores es un mecanismo fisiológico de retroalimentación muy importante que permite proteger a las células de la sobreestimulación aguda o crónica (*Ferguson, 2001*). En este punto juegan un papel esencial la familia de quinasas de receptores acoplados a proteínas-G (GRKs) y las proteínas citosólicas arrestinas, que van a promover la desensibilización de receptores GPCRs activados por agonistas (*Lefkowitz, 2004; Lefkowitz, 2005; Naga Prasad, 2001; Premont, 2007*). La desensibilización de receptores dependiente de agonistas tiene lugar en múltiples pasos. Primero, las GRKs fosforilan el tercer bucle citoplasmático o el extremo carboxilo terminal del receptor activado por ligando, un proceso que aumenta la afinidad del receptor por la proteína citosólica  $\beta$ -arrestina. La unión al receptor fosforilado de  $\beta$ -arrestina no sólo provoca el desacoplamiento del receptor de la proteína G heterotrimérica, reduciendo y evitando la señalización del receptor vía proteína G, sino que también promueve la internalización al compartimento endosomal, vía clatrina, de los receptores inactivados para su degradación o su re-sensibilización (*Lefkowitz, 2004; Lefkowitz, 2005; Naga Prasad, 2001; Liu, 2005*).

Es importante señalar que, aparte de su papel en la desensibilización de los receptores, las  $\beta$ -arrestinas pueden regular también la transducción de señales. El complejo GPCR- $\beta$ -arrestina internalizado puede formar un “señalosoma” que activa distintas proteínas implicadas en diversas rutas de señalización como son ERK1/2, p38 MAPK y JNK (*Reiter, 2006*). Además, las  $\beta$ -arrestinas actúan como proteínas adaptadoras que interaccionan con multitud de proteínas, organizando espacio-temporalmente distintas cascadas de señalización. Así, las arrestinas pueden conectar los GPCRs con las rutas de la tirosina quinasa c-Src y las rutas de PI3K/Akt y NF- $\kappa$ B (*Prossnitz, 2004; Pierce, 2001; DeWire, 2007*), participando en la modulación de la actividad transcripcional de diversos factores nucleares. Como veremos con más detalle en esta memoria, también las GRKs presentan actividades adicionales a su papel clásico como quinasas de GPCRs activados.

### 1.- GRKs (G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR KINASES).

Las GRKs constituyen una familia de quinasas formada por siete miembros en mamíferos y dos ortólogos en *Drosophila* que fosforilan residuos serina/treonina de GPCRs activados por agonistas, promoviendo procesos de desensibilización, internalización, reciclaje y/o degradación del receptor, en combinación con las proteínas arrestinas. Estas quinasas son además capaces de fosforilar sustratos de membrana no GPCRs, así como sustratos citosólicos. Por otro lado, las GRKs pueden contribuir a modular funciones celulares de forma independiente de fosforilación debido a su capacidad de interaccionar con una gran variedad de proteínas implicadas en señalización y tráfico (*Premont, 2007; Ribas, 2007*).

El hecho de que las GRKs presenten un complejo entramado de interacciones funcionales y de mecanismos regulatorios, y de que se encuentren alteradas en diversas situaciones patológicas, sugiere un importante papel fisiológico para estas quinasas (*Suo, 2004; Penela, 2006; Penela, 2008; Dorn, 2009*).



## 1.1.- La familia de las GRKs. Clasificación, estructura y especificidad de sustrato.

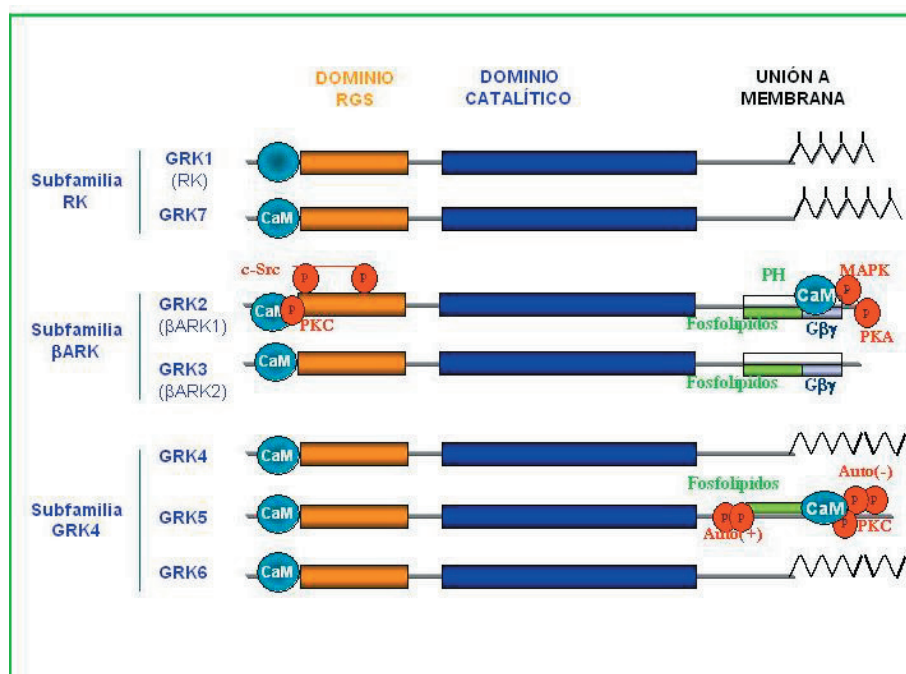
### 1.1.1.- Clasificación.

Basado en la homología de secuencia, la familia de GRKs en mamíferos, se clasifica en tres subfamilias (Premont 1995; Pitcher, 1998): la subfamilia de la rodopsina quinasa RK (GRK1 y GRK7), la subfamilia de las quinasas del receptor  $\beta$ -adrenérgico  $\beta$ ARK (GRK2 y 3) o subfamilia de GRK2, y la subfamilia de GRK4 (en la que se incluyen GRK4, 5 y 6). GRK2, 3, 5 y 6 se expresan ubicuamente en todos los tejidos de mamífero, mientras que GRK1 sólo se expresa en la retina y la glándula pineal, GRK7 en los conos visuales y GRK4 en los testículos, cerebelo y riñón (Sallese, 1997; Virlon, 1998; Sallese, 2000). Un grado mayor de heterogeneidad se obtiene dentro de las GRKs por el procesamiento alternativo de GRK4 y 6, que generan múltiples isoformas (Pitcher, 1998).

Sólo se conocen dos GRKs en *Drosophila*, las proteínas Gprk1 y Gprk2, que comparten homología muy significativa con los miembros de mamíferos de las subfamilias de GRK2 y GRK4, respectivamente. La proteína Gprk1 modula la amplitud de la respuesta visual, mientras que Gprk2 se requiere para regular los niveles de AMPc durante la ovogénesis de *Drosophila* (Schneider, 1997; Lannutti, 2001).

### 1.1.2.- Estructura.

Las GRKs presentan una organización estructural común, diferenciándose tres dominios (figura I 2): un dominio catalítico central (~270 aminoácidos), homólogo al de otras quinasas serina/treonina, flanqueado por un dominio amino-terminal (~185 aminoácidos) y un dominio carboxilo-terminal de longitud variable (~105-230



**FIGURA I 2.- CLASIFICACIÓN DE LAS QUINASAS DE RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GRKS).**

Hasta la fecha se han clonado en mamíferos siete miembros de la familia de GRKs que, en función de sus características estructurales y homología, se agrupan en tres subfamilias: la subfamilia Rodopsina quinasa (GRK1 y GRK7), con una distribución tisular limitada en retina, glándula pineal (GRK1) y en conos (GRK7); la subfamilia de las quinasas de receptores  $\beta$ -adrenérgicos o subfamilia de GRK2 (GRK2 y GRK3), que presentan distribución ubicua y altos niveles de expresión, con ciertas excepciones como que GRK3 es

la única GRK expresada en epitelio olfativo; subfamilia GRK4 (GRK4, GRK5 y GRK6), GRK5 y 6 se expresan de forma ubicua mientras que GRK4 lo hace principalmente en testículos, cerebro y riñón. Todas comparten una organización similar con un dominio catalítico central bien conservado y con alta homología al de otras serina/treonina quinasas como AKT ó PKA; un dominio N-terminal, relativamente conservado entre las distintas GRKs y que incluye un dominio de homología RGS, y un dominio C-terminal variable en estructura y función, responsable de proporcionar los distintos mecanismos de anclaje de GRKs a la membrana donde se encuentran la mayoría de sus sustratos (Pitcher, 1998; Ribas, 2007).

## INTRODUCCIÓN

aminoácidos) (Penn, 2000; Penela, 2003; Ribas, 2007).

El dominio N-terminal parece estar implicado en el reconocimiento del receptor y el anclaje a membranas intracelulares (García-Higuera, 1994; Murga, 1996). Contiene un dominio RH (dominio de homología a RGS, regulador de la señal de proteínas G), de unos 120 aminoácidos, que proporciona un mecanismo potencial por el que las GRKs pueden regular la señalización mediada por GPCRs de forma independiente de la fosforilación de receptores. Además, GRK4-6 presentan en esta región un dominio de unión para fosfatidil-inositol-(4,5)-bifosfato (PIP2), altamente conservado, que aumenta la actividad catalítica de las quinasas por su unión a las membranas (Pitcher, 1998).

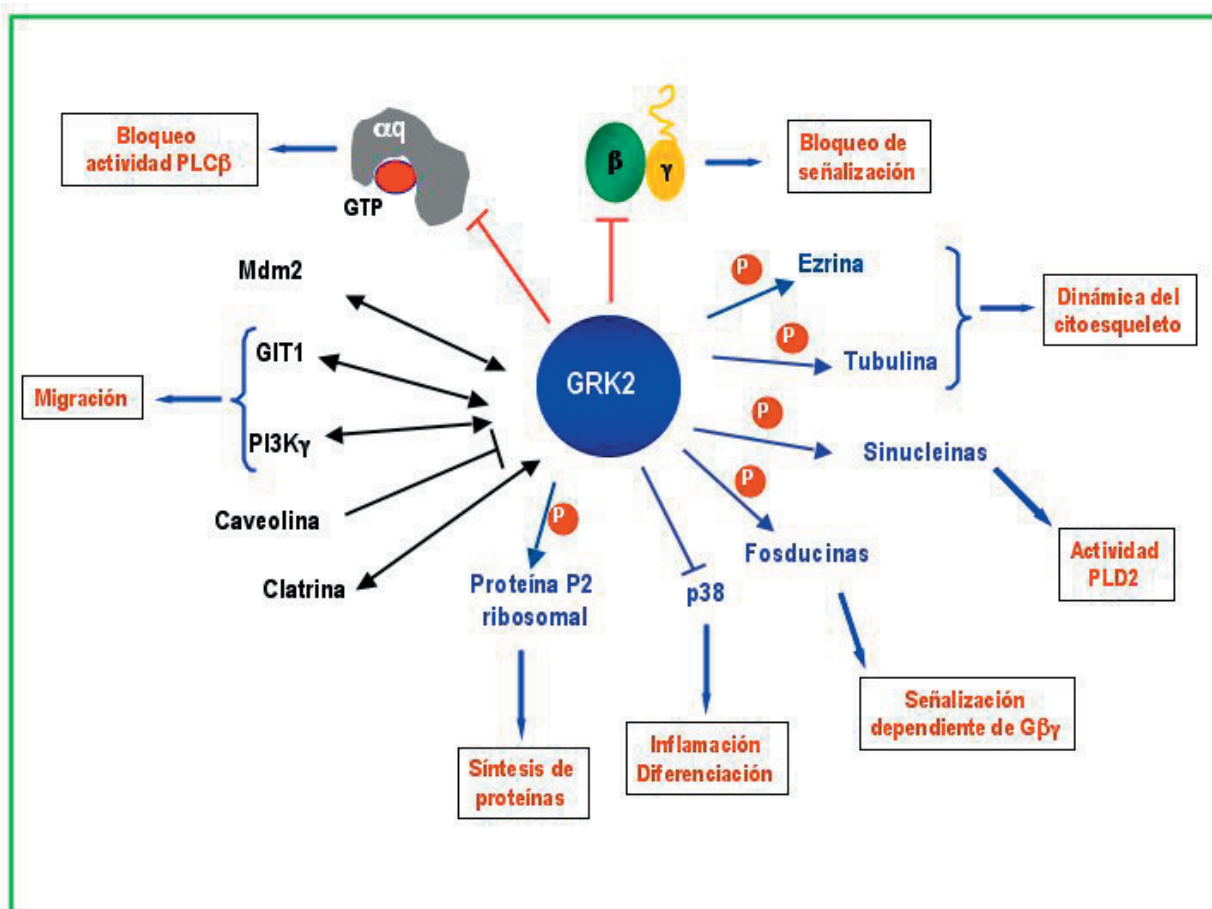
El dominio C-terminal de las GRKs contribuye a su localización subcelular y a la translocación dependiente de agonista, favoreciendo su interacción con lípidos y otras proteínas de membrana (Kohout, 2003; Reiter, 2006; Penela, 2006; Penela, 2003; Pitcher, 1992; Koch, 1993). La región C-terminal es la más variable dentro de la familia, presentando mayor longitud en el caso de GRK2 y 3. El dominio C-terminal de esta subfamilia de quinasas contiene el dominio de homología a plectrina (PH), importante para la translocación de las quinasas citosólicas a la membrana tras activación de los receptores (Sallese, 2000). Dentro de este dominio se localiza una región rica en Gly, el dominio de interacción a la subunidad  $G\beta\gamma$  (Eichmann, 2003), que favorece la localización de GRK2 en la membrana (Willems, 2003), y los sitios de unión para el fosfolípido de membrana PIP2 (Koch, 1993; Touhara, 1995). Recientemente se ha descrito que GRK2 presenta un dominio adicional de unión a  $G\beta\gamma$ , en los primeros 53 aminoácidos (Eichmann, 2003), que también favorece la localización de la quinasa en la membrana (Willems, 2003). GRK4 y GRK6 están palmitoiladas post-transduccionalmente en una o más Cys en sus últimos 15-20 aminoácidos del dominio C-terminal, permitiendo que se localicen constitutivamente asociadas a la membrana (Pitcher, 1998). GRK5 también se encuentra predominantemente asociada a la membrana por presentar un dominio de unión a PIP2 en su dominio N-terminal y una región polibásica (aminoácidos 546-560) cerca de su extremo C-terminal, que permiten la unión a fosfolípidos (Pronin, 1998). GRK1 y GRK7 presentan localización de membrana pues son farnesiladas en su dominio C-terminal.

### 1.1.3.- Especificidad de sustrato.

La existencia de sólo siete GRKs (con sus variantes de procesamiento) para regular más de 1000 GPCRs plantea la necesidad de una cierta redundancia funcional entre las GRKs y la existencia de mecanismos que modulen la especificidad de estas quinasas por sus sustratos. La interacción receptor/GRK será definida por la actividad relativa de las quinasas, la localización subcelular y los niveles de expresión de las diferentes GRKs en cada situación (Penela, 2003; Ribas, 2007).

### 1.2.- Papeles funcionales de las GRKs.

Como ya hemos mencionado anteriormente, aunque las GRKs fueron inicialmente descritas como quinasas que fosforilaban específicamente GPCRs activados por ligando, en la actualidad se han identificado nuevos sustratos no GPCRs y nuevos papeles en distintas rutas de señalización independientes de la actividad quinasa (**figura I 3**). Así, con la activa participación de nuestro grupo, datos recientes están desvelando nuevas interacciones funcionales de las GRKs (en particular de la isoforma GRK2) con vías de señalización importantes en la función del sistema cardiovascular e inmune (PI3K, p38 MAPK (Peregrin, 2006),  $G\alpha_q$ , Src), diversas proteínas relacionadas con el control de la proliferación y la supervivencia celular (Mdm2 (Salcedo, 2006)) o migración celular (factor regulador de adhesiones focales GIT, PI3K, receptores de quimioquinas) (Pitcher, 1998; Penela, 2003; Kohout, 2003; Lorenz, 2003) (**figura I 3**).



**FIGURA 1 3.- NUEVAS FUNCIONES DE GRK2.**

En los últimos años, se han descrito funciones adicionales de GRKs que distan de la clásica fosforilación de GPCRs activados (revisado en Penela, 2003; Ribas, 2007). Por un lado, GRK2 como quinasa actúa sobre distintos sustratos modulando diferentes procesos celulares, y por otro lado, de forma independiente de actividad quinasa se están revelando nuevas interacciones funcionales de GRK2 con diversas proteínas.

El significado funcional de estas interacciones se conoce sólo parcialmente, pero posibilita que las GRKs, de modo independiente de su papel como quinasas, modifiquen la actividad, localización, estabilidad o capacidad de interacción de estos factores, u otros por determinar, con sus moléculas efectoras.

#### 1.2.1. Fosforilación de sustratos no GPCRs.

Datos recientes indican que tanto las arrestinas como las GRKs pueden modular otras familias de receptores de membrana distintas a los GPCRs. GRK2 tiene la capacidad de fosforilar y regular a EGFR y PDGFRβ, reduciendo la actividad de este último receptor (Freedman, 2002; Hildreth, 2004). La unión del agonista al receptor EGFR conduce a la interacción con GRK2, promoviendo la fosforilación de la quinasa en residuos de tirosina (identificados como sitios de fosforilación por Src, ver más adelante) y al aumento de la actividad de la quinasa, que fosforila al receptor y lo conduce a la internalización (Chen, 2008). GRK2 también regula la actividad de canales epiteliales de Na<sup>+</sup> (ENaC). La fosforilación del canal bloquea su ubiquitilación y posterior internalización, manteniendo el estado activo del canal (Dinudom, 2004; Sánchez-Perez, 2007).

## INTRODUCCIÓN

Asimismo, sustratos diferentes a receptores de membrana también son fosforilados por GRK2. Por un lado se ha descrito que las GRKs fosforilan proteínas citosólicas como fosducinas, modulando su interacción con los dímeros  $G\beta\gamma$  y la señalización mediada por estas moléculas (Ruiz-Gómez, 2000), sinucleinas (Pronin, 2000), tubulina (Carman, 1998) o el factor ribosomal P2 (Freeman, 2002); pudiendo modular, entre otros procesos, la síntesis de proteínas o la arquitectura del citoesqueleto. En este sentido, también la proteína ezrina (de la familia ERM ("Ezrin, Radixin, Moesin")) es sustrato de la actividad de la quinasa, siendo necesaria la fosforilación en la treonina 567 para que la proteína adopte la conformación activa requerida para mediar la internalización de receptores y la organización del citoesqueleto (Cant, 2005). Recientemente, se ha implicado a GRK2 en el proceso de resistencia a insulina promovido por la fosforilación del sustrato del receptor de insulina IRS y el aumento en su degradación (Usui, 2005).

GRK2 también se ha implicado en procesos de diferenciación de adipocitos mediante la fosforilación de la MAPK p38 en la treonina 123. Este residuo se localiza en el "Docking Groove" o sitio de anclaje y su fosforilación impide la interacción de p38 con activadores y sustratos de la quinasa (Peregrin, 2006). GRK2 también es un modulador de la señalización de  $TGF\beta$  (Ho, 2005; Ho, 2007) ya que fosforila a los R-Smads bloqueando su translocación al núcleo e inhibiendo, por tanto, la expresión de genes apoptóticos dependientes de  $TGF\beta$ .

### 1.2.2. Regulación de otras proteínas de forma independiente de fosforilación.

Además de las funciones anteriormente descritas para las GRKs en procesos de señalización dependientes de fosforilación, las GRKs son proteínas "multidominio" capaces de interactuar con proteínas modulando su actividad/localización, de forma independiente de la actividad quinasa. Dentro de este conjunto de interacciones se ha descrito que GRK2 interactúa con RKIP, PI3K, AKT, factor regulador de adhesiones focales GIT, Clatrina, MEK1, Hsp90 o  $G\alpha_q$  (Premont, 1998; Lorenz, 2003; Luo, 2003; Penela, 2003; Jimenez-Sainz, 2006; Ribas, 2007) (ver figura I 3).

## 1.3.- Regulación de la actividad y localización subcelular de las GRKs.

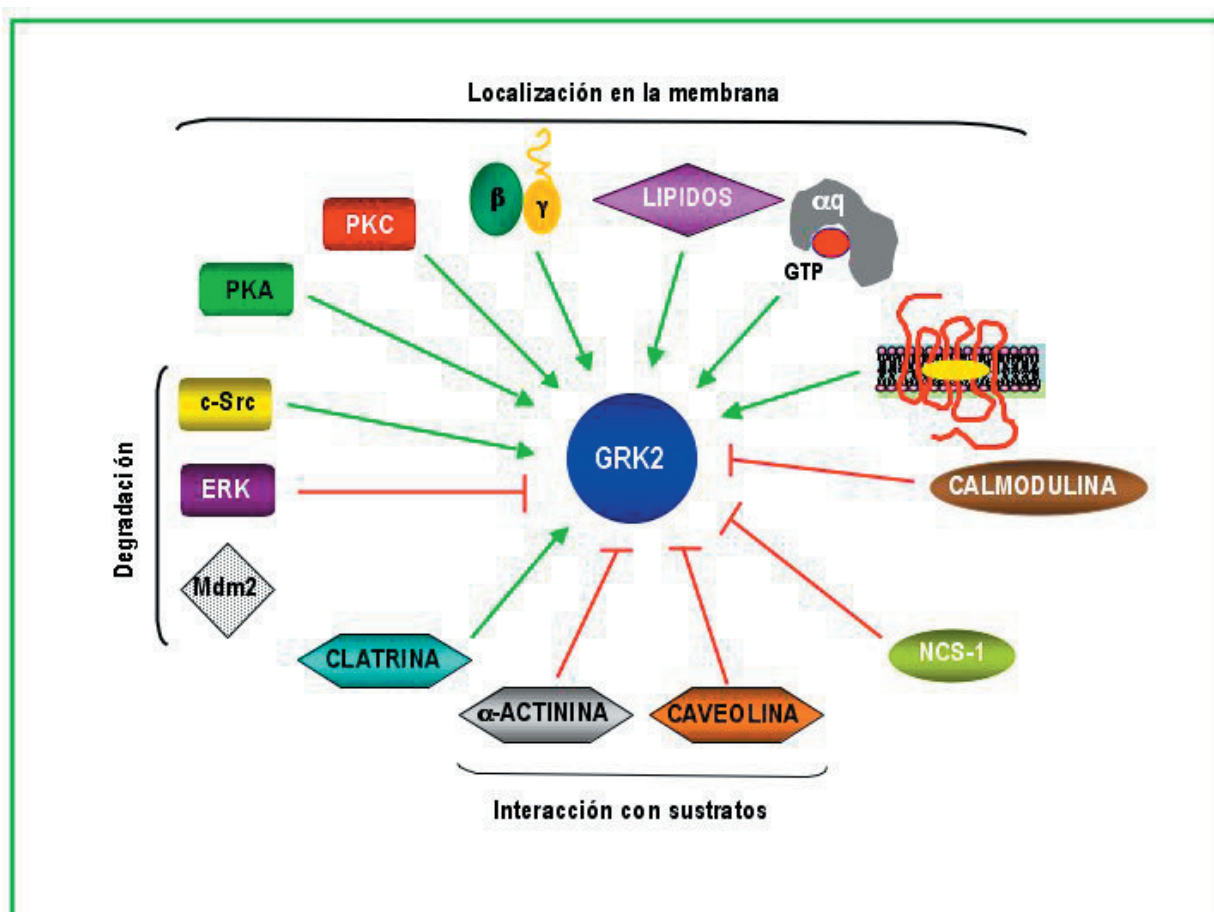
La actividad y la localización subcelular de las GRKs es el resultado de las interacciones que se establecen entre las quinasas y diversos componentes celulares (figura I 4). Estas interacciones están sujetas a una activa regulación, normalmente específica para cada quinasa, por parte de proteínas diferentes que en respuesta a un estímulo activarán o inhibirán a una GRK concreta.

### 1.3.1.- Regulación de GRKs por subunidades $G\beta\gamma$ y lípidos.

Todas las GRKs se pueden considerar quinasas que dependen de lípidos, ya que todas interactúan con fosfolípidos de membrana y dicha interacción es necesaria para la óptima fosforilación de los GPCRs activados. Mientras que GRK1, GRK7 y GRK4-6 se localizan basalmente asociadas a membrana, GRK2 y GRK3 son proteínas citoplasmáticas que deben translocarse transitoriamente a la membrana plasmática tras la estimulación de los receptores. Para ello, interactúan con PIP2 y otros fosfolípidos ácidos de las membranas celulares a través de su dominio de homología a plectrina (PH). Además de permitir la interacción de las quinasas con la membrana, esta interacción aumenta la actividad quinasa de GRK2-3 frente al GPCR activado, no sólo aumentando la concentración "local" de la quinasa en la membrana, sino también induciendo efectos alostéricos que favorecen la actividad de la quinasa frente a sustratos citosólicos (DeBurman, 1995; DeBurman, 1996).

En GRK2-3 el dominio PH solapa con el dominio de interacción con  $G\beta\gamma$ , interacción que también

sirve para dirigir específicamente la quinasa al sitio de la membrana plasmática donde el receptor está siendo activado. Además, esta interacción provoca cambios conformacionales en la quinasa que conllevan un aumento de su actividad catalítica favoreciendo, por tanto, la fosforilación del receptor (*Pitcher, 1995*). La interacción de GRK2 con  $G\beta\gamma$  requiere la presencia de residuos hidrofóbicos localizados en la mitad del dominio PH (Arg 587) y en la  $\alpha$ -hélice extendida (Lys 663, 665, 667) (*Carman, 2000*). GRK2 se une a  $G\beta\gamma 1$  y  $G\beta\gamma 2$  mientras que GRK3 interacciona con  $G\beta\gamma 3$ , por lo que las subunidades  $G\beta\gamma$ , además de dirigir la quinasa a la membrana, determinan en parte la especificidad de sustrato de estas enzimas (*Daaka, 1997*).



**FIGURA 1 4.- REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD Y LOCALIZACIÓN DE GRK2.**

Las quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) están altamente reguladas tanto en su función como en su localización subcelular por distintas proteínas de unión a calcio, lípidos, quinasas y otros factores de regulación que, o bien conducen a la activación de la quinasas (flecha verde), a su inhibición (línea roja), o a cambios en la localización y/o estabilidad de la proteína sin modular su actividad (ausencia de símbolo) (revisado en *Penela, 2003*).

La estructura cristalina de GRK2 revela que los dominios RGS, catalítico y PH se sitúan tridimensionalmente en los vértices de un triángulo estableciendo contactos entre sí, actuando el dominio RGS como eje transmisor de cambios alostéricos desde el dominio PH al dominio catalítico. En ausencia de lípidos o dímeros  $G\beta\gamma$ , el centro catalítico se encuentra en una conformación “abierto” o inactiva, similar a la de otras quinasas en estado basal (PKA, c-Src). La unión de  $G\beta\gamma$  parece ordenar la región C-terminal del dominio PH, permitiendo la unión cooperativa de los fosfolípidos. Como consecuencia de ello, se modifica la interfase entre el dominio PH y el dominio RGS, transmitiéndose tal cambio al centro catalítico y produciéndose la activación de la quinasa (*Lodowski, 2005*).



## INTRODUCCIÓN

### 1.3.2.- Interacción con GPCRs y proteínas $G\alpha$ .

El extremo N-terminal de las GRKs, que precede al dominio RGS parece estar involucrado en la interacción con la forma activada de los GPCRs (revisado en *Penn, 2000*). El dominio RGS de GRK2 y 3 permite la interacción con la subunidad  $G\alpha_q$  en su estado activo y de transición, reduciendo la activación de su efector fosfolipasa  $C\beta$  (PLC $\beta$ ), al bloquear la interacción de éste con la proteína  $G\alpha_q$ . Se ha propuesto que esta interacción podría aumentar también la actividad de GRK2 frente a los GPCRs, de tal modo que la quinasa podría ser un nuevo efector de  $G\alpha_q$  (*Carman, 1999; Sallesse, 2000*) y permitiría una parada más rápida de la señalización vía proteínas G (*Mariggio, 2006*). Además, se ha descrito que los residuos críticos para la interacción de GRK2 con  $G\alpha_q$  (*Sterne-Marr, 2003*) no interfieren en la unión de otras proteínas RGS (1-4) y permiten la existencia de complejos ternarios. El dominio RGS de otros miembros de la familia no interacciona con  $G\alpha_q$  pero no puede descartarse que no module otras proteínas  $G\alpha$  diferentes (*Kozasa, 2001*).

### 1.3.3.- Regulación de las GRKs por proteínas de unión a calcio.

Los niveles celulares de calcio parecen modular la actividad de las GRKs a través de la interacción con distintas proteínas sensoras de calcio (*Sallesse, 2000*). Recoverina, una proteína de unión a calcio presente en células fotorreceptoras, se une e inhibe GRK1 proporcionando un mecanismo para modular su actividad durante las situaciones de oscuridad (alto niveles de calcio) y de luz (bajo niveles de calcio). Otros homólogos de recoverina como NCS-1, VILIP-1 e hipocalcina también son capaces de inhibir GRK1 (*Sallesse, 2000*).

Por otro lado, la proteína calmodulina (CaM), un mediador universal de la señal de calcio implicado en plasticidad sináptica y en la activación de NFAT (*Lisman, 2002; Hogan, 2003; rev. en Burgoyne, 2007*), puede inhibir la actividad de GRK2-6, aunque con diferente potencia (*Pronin, 1997*): GRK5 es muy sensible a la presencia de la forma  $Ca^{+2}/CaM$  ( $IC_{50}$  de 40-50 nM) mientras que GRK2 sólo se ve afectada a altas concentraciones de  $Ca^{+2}$  ( $IC_{50}$  de 2  $\mu M$ ), lo que exige unas concentraciones muy superiores a los valores fisiológicos habituales (*Sallesse, 2000*). La consecuencia funcional de una regulación diferencial de los subtipos de GRK por CaM es una disminución preferente de la actividad de ciertas GRKs frente al GPCR. Así, se sugiere que GRK5 será menos apropiada para participar en la regulación de receptores acoplados a la señal de calcio.

Además, se ha descrito que GRK2 interacciona con el sensor neuronal de calcio 1 (NCS-1), modulando la desensibilización de los receptores de dopamina D2 mediada por esta quinasa (*Kabbani, 2002*).

El dominio de interacción de las GRKs con CaM se localiza en el extremo N-terminal de GRK2-7 y, además, en el extremo C-terminal de GRK2 y GRK5 (**figura 12**). Por ello, la unión de CaM a GRK2 silencia la actividad catalítica de la quinasa interfiriendo en su interacción con los sustratos, induciendo cambios conformacionales inhibitorios o secuestrando  $G\beta\gamma$  (esencial en la activación de estas quinasas), como se propuso en un principio. En el caso de GRK5 (más sensible a  $Ca^{+2}/CaM$ ), el sitio de unión compite por la unión de PIP2, bloqueando su acceso a la membrana. Por tanto, el efecto inhibitorio de CaM sobre la fosforilación de GPCRs por GRK5 no se debe a la inhibición de la actividad de la quinasa, sino al cambio en la localización subcelular de la misma. Hay también un cambio en el patrón de autofosforilación, siendo diferente el de GRK5 asociado a membrana del de GRK5 unido a  $Ca^{+2}/CaM$ . CaM estaría, por tanto, modulando la disponibilidad de los sustratos a la quinasa, de tal manera que GRK5 asociada a CaM presentaría una menor capacidad de fosforilar receptores de membrana pero una mayor capacidad frente a sustratos solubles citosólicos (revisado en *Sallesse, 2000*).

#### 1.3.4.- Regulación por modulación de la localización subcelular.

Las GRKs presentan una distribución subcelular compleja y altamente regulada. GRK2 es una proteína citosólica soluble y, sin embargo, existe una alta proporción de la quinasa asociada a membranas internas microsomales (García-Higuera, 1994; Murga, 1996), donde se encuentra en un estado inactivo. El dominio de interacción con microsomas se ha localizado en el extremo N-terminal de GRK2 (residuos 50-145) y la activación de proteínas G heterotriméricas activa la quinasa en este compartimento.

Al igual que ocurre con otras muchas proteínas implicadas en transducción de señales, se ha descrito la presencia de GRK2 en fracciones de membrana ricas en caveolinas (Carman, 1999). Estudios “in vitro” mostraron que GRK2 interacciona con caveolina a través de los motivos consenso de unión a caveolina presentes en el dominio PH (residuos 567-584) y en el dominio NH<sub>2</sub>-terminal (residuos 63-71) de la quinasa. La unión de caveolina a la región amino-terminal de GRK1, 2 y 5 inhibe fuertemente la actividad catalítica de las quinasas, pero podría estar facilitando la interacción de las GRKs con otras moléculas implicadas en señalización o regulación, ya que caveolina actúa como proteína adaptadora para una gran variedad de moléculas como GPCRs, MAPK y proteínas G.

GRK2 también ha sido detectada en vesículas endosomales, tras la activación del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico ( $\beta_2$ -AR), co-localizando con los receptores internalizados (Ruiz-Gómez, 1997; Schulz, 2002). De hecho, se ha descrito que GRK2 interacciona directamente con clatrina (Shiina, 2001) a través de un motivo consenso presente en la región C-terminal de GRK2. Esta interacción parece estar involucrada en la internalización promovida por agonista de ciertos receptores mediante un mecanismo dependiente de dinamina (Shiina, 2001) y podría ser capaz de modular la actividad de la quinasa (Penela, 2003), regulando la fosforilación de sustratos no GPCRs o la interacción con otras proteínas transductoras, como las MAPKs, de forma compartimentalizada (Jimenez-Sainz, 2006).

Finalmente, los miembros de la familia de GRKs son capaces de interactuar con  $\alpha$ -actinina. Aunque el significado funcional de esta interacción se desconoce es posible, que a través de esta proteína, GRK2 tenga acceso a potenciales sustratos relacionados con el citoesqueleto celular. Así, se ha demostrado que GRK2 fosforila y promueve el estado activo de ezrina (Cant, 2005), proteína esencial en la organización de estructuras corticales de actina.

#### 1.3.5.- Regulación por fosforilación por otras quinasas.

La fosforilación de las GRKs ha resultado ser un mecanismo importante para la regulación de su actividad, su interacción con otras proteínas y su estabilidad.

##### 1.3.5.1.- Fosforilación por quinasas de segundos mensajeros PKC y PKA.

Las quinasas de segundos mensajeros PKC y PKA fosforilan y modulan la actividad y la localización de algunos miembros de la familia GRK (Pronin, 1997; Chuang, 1995; Winstel, 1996; Krasel, 2001).

PKC fosforila tanto a GRK2 como a GRK5 “in vitro” e “in situ” con distintas consecuencias funcionales. La fosforilación de GRK2 por PKC tiene lugar en la Ser29 (Krasel, 2001), dentro del dominio de interacción con CaM, y parece estar liberando a GRK2 de su interacción inhibitoria con CaM (Krasel, 2001) y estimulando su translocación del citosol a la membrana plasmática para favorecer su asociación a GPCRs, sin afectar su actividad

## INTRODUCCIÓN

catalítica. Así, la fosforilación de GRK2 por PKC promueve la actividad de la quinasa frente a GPCRs pero no afecta a la actividad frente a sustratos solubles. Por el contrario, la fosforilación por PKC dentro de la región C-terminal de GRK5, en dos sitios próximos a los sitios de autofosforilación inhibitorios inducidos por CaM, inhibe fuertemente su actividad catalítica tanto frente a receptores de membrana como frente a sustratos solubles (*Pronin, 1998*). El patrón específico de distribución de las isoformas de PKC en diferentes células, así como las isoformas específicas de PKC activadas por distintos GPCRs, determinarán qué GRK será activada/inhibida y, por tanto, su disponibilidad para mediar los procesos de desensibilización de los receptores (*Krasel, 2001*).

También la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), activada por receptores acoplados a  $G\alpha_s$ , fosforila a GRK2 en la Ser685 (próxima al dominio de interacción con  $G\beta\gamma$ ), induciendo un aumento de la actividad de GRK2 frente a receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos. Sin embargo, la fosforilación por PKA no activa directamente GRK2, sino que aumenta la interacción de la quinasa con las subunidades  $G\beta\gamma$ , facilitando su translocación a la membrana y su interacción con el receptor activado. Esta modulación depende de la asociación de GRK2 con la proteína AKAP79, que actúa como proteína adaptadora organizando y compartimentalizando la interacción entre el receptor  $\beta$ -adrenérgico, GRK2, PKA y fosfatasas (*Cong, 2001*). PKA, por tanto, va a modular la desensibilización de ciertos GPCRs, a distintos niveles, mediante la fosforilación directa del receptor y potenciando la activación de GRK2.

### 1.3.5.2.- Fosforilación por c-Src y MAPK.

Los GPCRs pueden, además de activar PKA o PKC, actuar sobre otras quinasas como la tirosina quinasa c-Src y las MAPKs, que también pueden modular la actividad de GRK2. Así, los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos activados por agonista son fosforilados por GRK2, lo que permite la unión de  $\beta$ -arrestinas que, actuando como proteínas adaptadoras, reclutan c-Src al entorno del receptor (*Penela, 2001*). Esto permite que GRK2 sea fosforilada por esta quinasa en las tirosinas 13, 86 y 92, dentro de su dominio RGS (*Samago, 1999*). Esta fosforilación, además de aumentar la actividad catalítica de GRK2 frente a sustratos GPCRs y solubles, probablemente promoviendo cambios alostéricos que activen a la quinasa, aumenta la interacción con  $G\alpha_q$  (*Mariggio, 2006*) y promueve la degradación de la quinasa por la vía del proteasoma (*Penela 2001*).

También se ha descrito la fosforilación en la Ser670 de GRK2 por ERK1, mediante experimentos “in vitro” e “in situ” (*Pitcher, 1999; Elorza, 2000*), observándose una co-inmunoprecipitación de ambas proteínas de manera dependiente de agonista (*Elorza, 2000*). Esta fosforilación, localizada en el dominio de interacción con  $G\beta\gamma$ , debilita la interacción de GRK2 con el dímero  $\beta\gamma$ , inhibiendo la translocación de la quinasa a la membrana y su actividad frente a GPCRs. Se proporciona así un mecanismo de regulación retrógrado negativo de la quinasa, que pone fin al proceso de desensibilización de receptores. Además, al igual que ocurre con la fosforilación por c-Src, ERK1 promueve la degradación de GRK2 por la vía del proteasoma (*Elorza, 2003*).

### 1.3.6.- Regulación por nitrosilación.

Los procesos de desensibilización e internalización de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos están regulados por la S-nitrosilación de GRK2 en la Cys 340. Este mecanismo pone un freno a la actividad de GRK2, potenciando la señal del segundo mensajero (AMPc) y mitigando la internalización del receptor dependiente de agonista.

Es interesante apreciar que la Cys 340 se localiza en una lámina  $\beta$  que flanquea el bucle de activación del dominio catalítico. Por ello, la S-nitrosilación de la Cys 340 podría estar alterando la estructura del bucle de activación o la orientación de la Arg 316, inhibiendo la actividad de GRK2.



La S-nitrosilación es un mecanismo de regulación específico de GRK2-3, pues la Cys 340 está conservada en el homólogo GRK3 pero no en el resto de GRKs (Whalen, 2007).

#### 1.4.- Regulación de los niveles de GRKs.

Los niveles totales de la proteína GRK2 son el resultado del equilibrio entre los procesos que regulan su expresión génica y los que promueven su degradación proteolítica. La alteración de este equilibrio provoca cambios en los niveles de expresión de las distintas GRKs que, en ocasiones, pueden observarse en situaciones fisiopatológicas. Así, se han descrito alteraciones en la expresión de GRK2 en hipertiroidismo, isquemia, fallo cardíaco, fibrosis quística pulmonar, artritis reumatoide, hipertensión, adicción a opiáceos y enfermedad de Alzheimer (Ammon-Treiber, 2005; Suo, 2004; Leosco, 2007; Obrenovich, 2008).

En ocasiones los niveles de proteína y los de mRNA no van parejos, por lo que necesariamente deben existir mecanismos que, además, modulen la relación transcripción-traducción de las GRKs (Dorn, 2000; Lombardi, 2002; Feldman, 2002; Cobelens, 2007).

##### 1.4.1.- Regulación de las GRKs a nivel transcripcional.

El promotor de GRK2 es similar a los promotores de genes típicos de “housekeeping”, que presentan una actividad transcripcional constitutiva con poca regulación (Penn, 1994). Pocos trabajos hay que hayan descrito la regulación transcripcional de estas quinasas. Estudios realizados en nuestro laboratorio muestran que en células de músculo liso de aorta, agentes que inducen vasoconstricción e hipertrofia (ésteres de forbol) aumentan la actividad del promotor de GRK2, mientras que citoquinas pro-inflamatorias (IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$ ) actúan en el sentido opuesto (Ramos-Ruiz, 2000). Así, parece existir una cierta correspondencia entre los niveles de GRKs y el estado funcional de los GPCRs. En ese sentido los datos obtenidos mediante la activación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos en el corazón (Iaccarino, 1998), así como la estimulación mitótica de las células T (De Blasi, 1995), muestran un aumento de la expresión de mRNA de GRK2. Recientemente se han identificado, además, vías de señalización implicadas en regular la expresión génica del mRNA de GRK2 de manera específica del tipo celular. Así, la cascada de señalización dependiente de TGF $\beta$  aumenta los niveles de mRNA y la expresión de GRK2 en células epiteliales (Ho, 2005), mientras que en linfocitos la activación transcripcional de la quinasa se produce por los factores NFAT, AP1 y NF $\kappa$ B (Iñiguez, Ribas y col, manuscrito en preparación).

##### 1.4.2.- Regulación traduccional de la expresión de GRKs.

Recientemente se ha descrito un nuevo mecanismo de regulación del nivel de la proteína GRK2 a nivel traduccional. Los niveles de GRK2 detectados en perfusión tras tratamientos de hipoxia/isquemia en ratas se encuentran disminuidos, sin mostrar cambios en los niveles de mRNA (Cobelens, 2007). De igual modo, células de glioma de rata C6 sometidas a estrés oxidativo (tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) presentan niveles menores de GRK2. Estos cambios en los niveles de la quinasa no son reflejo de un aumento de la velocidad de degradación de la proteína ni de cambios en los niveles de mRNA, sino de una reducción en la traducción del mensajero. La activación de calpaina y cdk1/2 por estrés oxidativo inhibe la traducción de GRK2 (Cobelens, 2007).

##### 1.4.3.- Regulación post-traduccional: degradación de las GRKs.

Distintos estudios han postulado que la regulación de la estabilidad de GRK2 constituye un mecanismo importante para modular los niveles de expresión de la proteína.

## INTRODUCCIÓN

La degradación de GRK2 por el proteasoma es absolutamente dependiente de su actividad catalítica y del reclutamiento de  $\beta$ -arrestinas (Penela, 2001). La capacidad de  $\beta$ -arrestina de promover la degradación de la quinasa parece implicar el reclutamiento de proteínas quinasas como c-Src y MAPK (Elorza, 2000; Sarnago, 1999; Penela, 2001). La fosforilación de GRK2 por estas quinasas estimula el reciclaje de la quinasa por la vía del proteasoma, aumentando el grado de ubiquitilación de GRK2 por la acción de la E3 ligasa Mdm2 (murine double minute 2) (Salcedo, 2006). Los agonistas adrenérgicos y la sobre-expresión de arrestinas estimulan la degradación proteolítica de GRK2, pues favorecen el reclutamiento de Mdm2 al entorno del receptor y, por tanto, la ubiquitilación de la quinasa. Sin embargo, la activación de la ruta de PI3K/Akt por IGF-1 (insulin like growth factor-1) altera la degradación de GRK2 mediada por Mdm2, aumentando la estabilidad de la quinasa (Salcedo, 2006).

Los mecanismos de degradación de GRK2 muestran una gran complejidad, ya que el proteasoma no es la única proteasa capaz de modular el recambio de GRK2. Así, estudios realizados en nuestro laboratorio muestran que tanto el estrés oxidativo inducido por exposición a  $H_2O_2$  en linfocitos (Lombardi, 2002) como la producción de especies reactivas de oxígeno tras el tratamiento con las citoquinas IL-6 e  $INF\gamma$  (Lombardi, 1999; Lombardi, 2002) en diferentes tipos celulares parecen inducir una reducción de los niveles de GRK2.

### 1.5.- GRKs en situaciones fisiopatológicas.

Aunque se han generado ratones deficientes en cada uno de los 7 miembros de las GRKs, sólo los ratones KO de GRK2 son letales en estadio embrionario (muerte a los E11.5-14.5 días), presentando anomalías cardíacas, incluyendo hipoplasia de miocardio, dilatación de la pared, y una menor contracción ventricular (Jaber, 1996). La deficiencia de otras GRKs afecta a un nicho concreto en el individuo. GRK1 afecta a la visión (Lyubarsky, 2000; Liu, 2005), GRK3 a la captación de olores (Peppel, 1997), GRK5 produce un fenotipo asmático (Walker, 2004) y GRK6 causa hipersensibilidad a la cocaína y anfetaminas (no se produce desensibilización de receptores de dopamina en el SNC) (Gainetdinov, 2003). La letalidad embrionaria por falta de GRK2 indica que, o bien GRK2 presenta un papel en el desarrollo embrionario que no puede ser realizado por otra quinasa, o bien que la expresión espacio-temporal de la quinasa es única en el desarrollo del embrión, no apareciendo la expresión de ninguna otra de las quinasas en ese momento y sitio específico durante el desarrollo. La eliminación específica de GRK2 en miocitos en estadios tempranos del desarrollo no afecta a su desarrollo normal y sólo presentan, como fenotipo cardíaco, un ligero aumento de la contractilidad cardíaca al llegar a adultos (Matkovich, 2006). Estos datos están indicando que GRK2 no presenta un papel esencial en el desarrollo cardíaco, sino más bien juega un papel esencial en la embriogénesis.

Se ha postulado que la sobre-activación de GRK2 contribuye a la patología de estimulación neuroendocrina sináptica en fallo cardíaco fomentando la disminución de la respuesta adrenérgica. La actividad miocárdica de GRK2 aparece aumentada del orden de dos o tres veces en pacientes con fallo cardíaco y está asociada con un aumento de los niveles de mRNA y de proteína de GRK2 (Bristow, 1990; Ungerer, 1994).

La hipertensión también se ha asociado con una expresión y función alterada de GRK. Pacientes con hipertensión presentan una expresión incrementada de GRK2 en linfocitos (Gros, 1999) y ratas hipertensas tienen también aumentada la expresión de la quinasa en células del músculo liso vascular (Gros, 2000). Por otro lado, aunque los ratones que sobre-expresan GRK5 son también hipertensos, no presentan hipertrofia aórtica o cardíaca. Además, la sobre-expresión de GRK5 en ratones machos y hembras conlleva distintos niveles de hipertensión, siendo la presión sanguínea mayor en el caso de los machos (Keys, 2005).

De igual modo, se ha descrito que la isquemia miocárdica va acompañada de una rápida activación

de GRK2 en los corazones de ratas isquémicas y de un aumento en el mRNA de GRK2 en las células cardíacas (Ungerer, 1996).

Además, las GRKs también sufren cambios en otras condiciones patológicas cardíacas. Por ejemplo, la expresión de GRK2 y GRK5 aparece elevada en modelos animales de disfunción cardíaca (Ping, 1997; Vinge, 2001; Yi, 2002) y en el ventrículo izquierdo de pacientes con cardiomiopatía dilatada y sobrecarga de volumen (Dzimiri, 2004). Por el contrario, GRK3 no sufre cambios en la cardiomiopatía dilatada pero aumenta ligeramente en pacientes con sobrecarga de volumen (Dzimiri, 2004; Vinge, 2001; Ungerer, 1993; Ungerer, 1996).

Por otro lado, se ha descrito una distribución anormal tanto de GRK2 como de GRK5 en ratones transgénicos modelos de la enfermedad de Alzheimer temprana en las fases iniciales de la enfermedad, y en modelos de células microgliales tratadas con concentraciones bajas del péptido A $\beta$ , y un aumento en la expresión de GRK2 en pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Suo, 2004; Leosco, 2007).

La disminución de los niveles de GRK2 en células inmunes durante la inflamación podría representar inicialmente un mecanismo adaptativo para facilitar la respuesta celular; sin embargo, un déficit crónico de GRK2 promovería una respuesta inflamatoria exagerada o aberrante. Células T aisladas de ratones hemicigotos para GRK2 muestran un aumento en la señalización y quimiotaxis promovida por ligandos de receptores CCR1 y CCR5 (Vroon, 2004) en comparación con células de ratones salvajes. Además, cambios en los niveles de GRK2 pueden modificar procesos celulares mediados por p38, tales como la diferenciación de adipocitos y la secreción de TNF $\alpha$  tras la estimulación con LPS, que está incrementada en macrófagos procedentes de ratones heterocigotos para GRK2 (Peregrín, 2006).

Se han descrito, además, alteraciones en la expresión de las GRKs en retinitis pigmentosa, fibrosis quística, hipotiroidismo, carcinoma diferenciado de tiroides o esclerosis múltiple (Vroon, 2005; revisado en Aragay, 1998; Penela, 2003). Asimismo, se ha podido detectar la hiper-regulación de la expresión de GRK5 en ciertas regiones del sistema límbico tras tratamientos crónicos con cocaína (Erdtmann-Vourliotis, 2001), así como el aumento de los niveles y de la actividad de GRK2 en el locus coeruleus de ratas expuestas de manera persistente a morfina (Terwilliger, 1994).

---

En el curso de nuestros estudios hemos descubierto dos nuevos sustratos de GRK2 (calsenilina/DREAM/KChIP3 y PS1), así como un nuevo papel funcional de Gprk2 en la ruta de Hedgehog en *Drosophila*. Por ello, con el fin de facilitar la comprensión de los resultados y de la discusión, se presenta una breve introducción de estas proteínas y de esta vía de señalización.

## 2.- CALSENILINA/DREAM/KChIP3: PROTEÍNA SENSORA DE CALCIO.

La diversidad de eventos controlados por el Ca<sup>2+</sup> pueden ser consecuencia de los distintos tipos de señales de Ca<sup>2+</sup> que difieren espacialmente, temporalmente y en magnitud, o consecuencia de la acción de distintas proteínas neuronales sensoras de Ca<sup>2+</sup> (NCS) que traducen la señal de calcio en cambios específicos en la función celular. Las proteínas NCS están implicadas en fototransducción, regulación de la liberación de neurotransmisores, crecimiento y supervivencia neuronal, control del metabolismo de nucleótidos cíclicos, control de la expresión génica, regulación de los canales iónicos y en el metabolismo de fosfoinosítidos (rev. en Burgoyne, 2007).

## INTRODUCCIÓN

### 2.1.- Identificación.

La proteína Calsenilina/DREAM/KChIP3 es una proteína neuronal sensora de calcio que ha sido identificada por tres grupos de forma independiente y ha recibido nombres distintos en base a las características de su identificación.

La primera en ser identificada fue calsenilina. Inicialmente fue descrita como una proteína de interacción con presenilinas (PSs) de forma dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  (Buxbaum, 1998). Estudios posteriores han mostrado que calsenilina no sólo se une a PSs sino que también regula los niveles de sus fragmentos carboxilo y amino terminales (ver más adelante en la introducción). Posteriormente, en la búsqueda de proteínas que se unieran al elemento de respuesta al gen de la *dinorfina* "DRE", Carrión y cols. (1999) identificaron la misma proteína, a la que denominaron DREAM ("Down-stream Regulatory Element Antagonist Modulator"), como una nueva proteína de interacción con el elemento DRE, capaz de reprimir la expresión de dinorfina de forma dependiente de calcio. Finalmente, An y cols. (2000), utilizando el extremo amino-terminal del canal de potasio dependiente de voltaje de tipo A, identificaron dos proteínas de interacción con los canales Kv que denominaron "potassium-channel interacting protein-1 y 2" (KChIP1 y KChIP2). Mediante el rastreo en la base de datos de cDNA se identificó un tercer componente de esta familia de proteínas que recibió el nombre de KChIP3 y que resultó ser calsenilina/DREAM. Recientemente, se ha identificado otra proteína capaz de interaccionar con el dominio C-terminal de PSs y con los canales de potasio dependientes de voltaje y ha recibido el nombre de "calsenilin-like protein" (CALP) o KChIP4 (Morohashi, 2002) (figura I 5).

### 2.2.- Estructura.

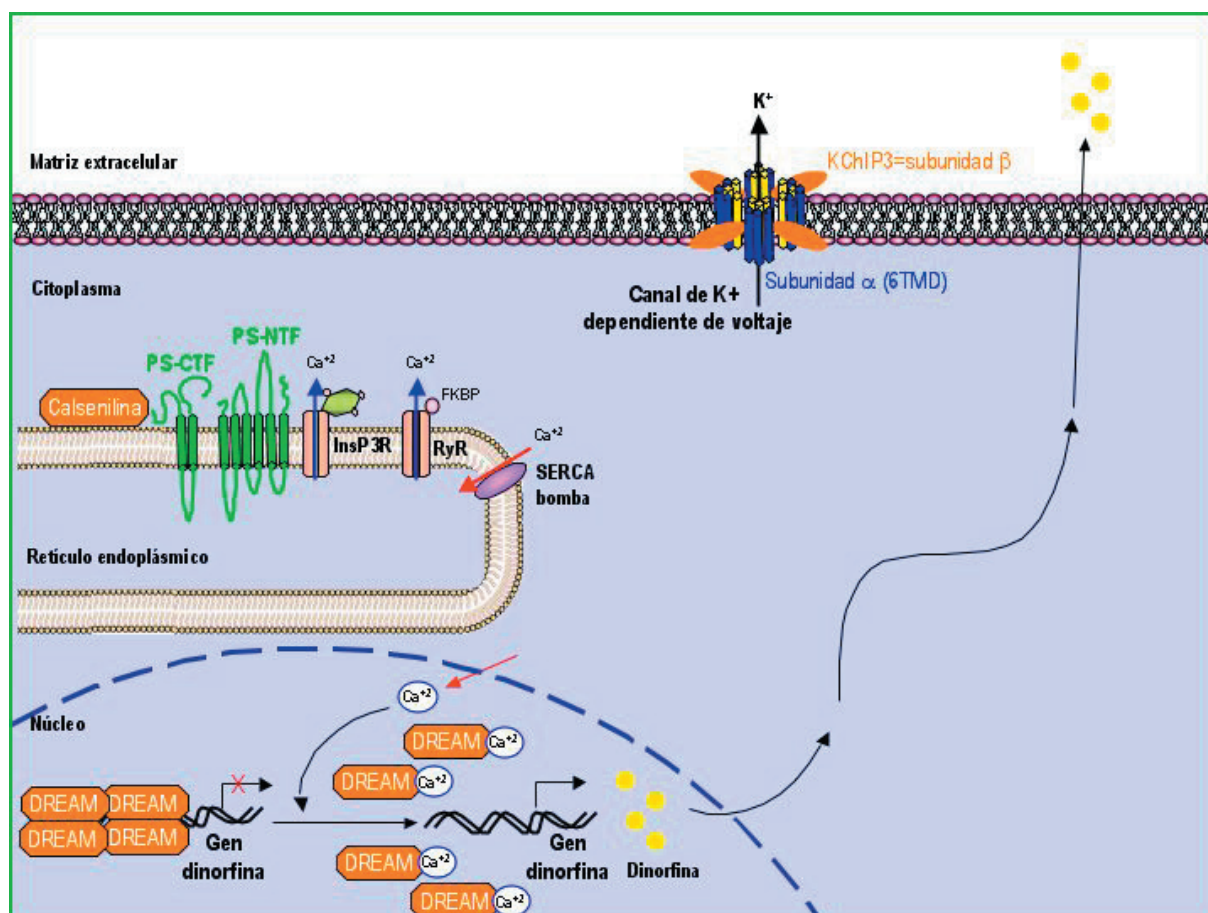
Calsenilina/DREAM/KChIP3 es una proteína neuronal de unión a  $\text{Ca}^{+2}$  relacionada estructuralmente con la familia de recoverina, familia que incluye visinina, frequenina y la proteína neuronal sensora de calcio-1 (NCS-1).

Al igual que los otros miembros de la familia de proteínas NCS, Calsenilina/DREAM/KChIP3 presenta 4 dominios "EF-hand" (figura I 6A). Éstos son estructuras hélice-bucle-hélice en las que dos  $\alpha$ -hélices, posicionadas perpendicularmente una respecto a otra, se unen por un bucle de unos 12 aminoácidos, que generalmente interviene en la unión a iones de calcio. Ensayos por espectrometría de resonancia magnética nuclear han mostrado que la forma de calsenilina unida a calcio forma un dímero estable en solución, que el dominio C-terminal 78-256 contiene los 4 "EF-hand" dispuestos en tanden, de forma similar a los encontrados en otras NCS de la superfamilia de la calmodulina (CaM), y que el  $\text{Mg}^{+2}$  se une a la 2ª "EF-hand" y el  $\text{Ca}^{+2}$  a la "EF-hand" 3ª y 4ª (rev. en Burgoyne, 2001) (figura I 6B).

### 2.3.- Funciones celulares de la proteína Calsenilina/DREAM/KChIP3.

#### 2.3.1.- Calsenilina.

Buxbaum y colaboradores describieron que calsenilina, al igual que CALP (Morohashi, 2002), y presenilina 2 (PS2) estaban presentes en un mismo complejo celular, pues ambas proteínas co-inmunoprecipitaban y co-localizaban cuando eran sobre-expresadas en células (Buxbaum, 1998). Calsenilina (o CALP) muestra un patrón de distribución citoplasmático difuso, pero la presencia de PS lleva a la localización de la proteína sensora de calcio a compartimentos de membrana en la célula.



**FIGURA 1 5.- FUNCIONES DE KChIP3.**

Calsenilina/DREAM/KChIP3 es una proteína multifuncional con funciones específicas en distintos compartimentos celulares: (i) en el núcleo, actúa como represor transcripcional dependiente de calcio (DREAM) (Carroll, 1999); (ii) en la membrana plasmática, interacciona con canales de potasio dependientes de voltaje tipo A (denominada KChIP3, potassium-channel interacting-protein 3) (An, 2000), (iii) en el retículo, interacciona con presenilinas (calsenilina) (Buxbaum, 1998), de forma dependiente de Ca<sup>2+</sup>, con papel importante en la apoptosis celular y el metabolismo del péptido β-amiloide.

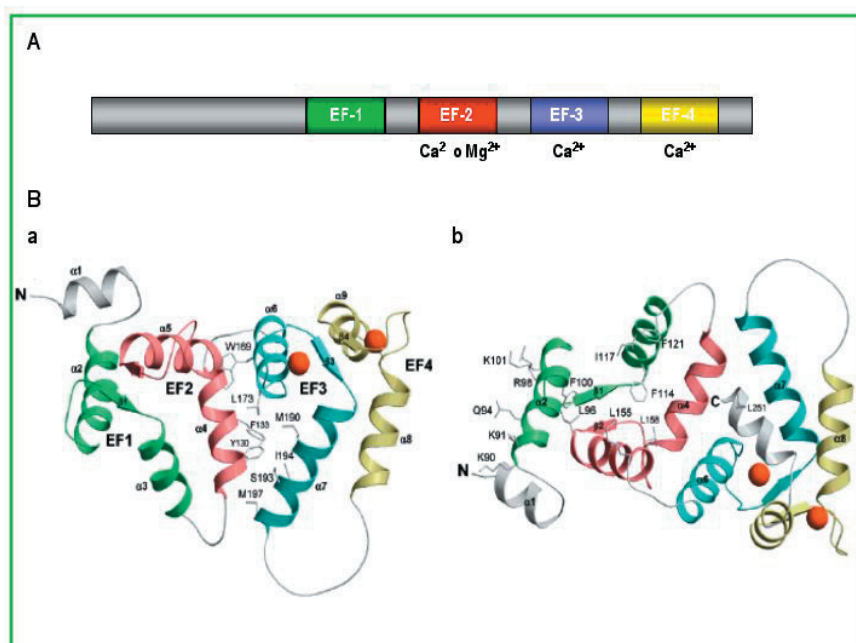
Se observó, además, que la co-expresión de calsenilina provocaba un aumento de los niveles de los fragmentos de PS, presentando la primera evidencia de la interacción funcional entre ambas proteínas.

Estudios realizados utilizando Oocitos de *Xenopus* mostraron que PS conducía a un aumento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular, mediado por IP<sub>3</sub>, y que calsenilina era capaz de revertir la función de PS en la homeostasis del calcio. Este proceso no se debía a un efecto “tamponante” de calsenilina, por su capacidad de unir calcio, ya que la inyección del mRNA de calsenilina no ejercía ningún efecto. Por tanto, es la interacción funcional entre calsenilina y PSs la que juega un papel esencial en la liberación de Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplásmico (RE) (Leissring, 2000).

Distintos estudios han puesto de manifiesto, además, el efecto de calsenilina en apoptosis. Calsenilina induce una mayor susceptibilidad de las células a los estímulos apoptóticos, posiblemente alterando la dinámica del calcio (Lilliehook, 2002). Además, la presenilina contribuye a este efecto pro-apoptótico, pues la apoptosis inducida por calsenilina disminuye en fibroblastos embrionarios de ratones deficientes en PS1 (PS1<sup>-/-</sup>) o en células neuronales que expresan de forma estable el mutante de falta de función de PS1 (Jo, 2001; Jo, 2003).



## INTRODUCCIÓN



**FIGURA I 6.- ESTRUCTURA DE DREAM.**

A) Representación esquemática de la estructura general de las proteínas NCS.

Estas proteínas presentan cuatro dominios "EF-hand", el primero de los cuales no puede unirse al ión Ca<sup>2+</sup>. Muchos miembros de la familia poseen un grupo miristoilo en su extremo amino-terminal. B) Representación tridimensional de la estructura de DREAM en solución determinada por NMR.

Los dominios "EF-hand" aparecen coloreados. Las esferas naranjas representan los iones de Ca<sup>2+</sup> unidos a DREAM. En a la molécula aparece girada 180° respecto a b.

(Modificación de la figura de *Lusin, 2008*).

Resultados adicionales sugieren una relación funcional entre calsenilina y presenilina en la formación del péptido  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ). Estudios realizados en células transfectadas con cantidades crecientes de calsenilina mostraron un aumento en la producción del péptido A $\beta$ 42. Además, la transfección de PS2 aumenta la formación de A $\beta$ , particularmente en presencia de calsenilina (Jo, 2001). Ratones deficientes para el gen de calsenilina muestran menores niveles de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 en el cerebelo (Lilliehook, 2003). Por otro lado, el tratamiento de células con A $\beta$  conlleva un aumento en la expresión de calsenilina (Jo, 2004), lo que corrobora el posible papel de esta proteína en la enfermedad de Alzheimer.

### 2.3.2.- DREAM (Down-stream Regulatory Element Antagonist Modulator).

En condiciones basales calsenilina/DREAM/KChIP3 se une a DRE reprimiendo la transcripción, mientras que la estimulación por Ca<sup>2+</sup> favorece su liberación del DNA y, por consiguiente, la transcripción (Carrión, 1999). Por tanto, DREAM proporciona un nuevo mecanismo de modulación de la expresión génica, en el cual un sensor de calcio se une directamente al DNA y regula la transcripción en función de la concentración de Ca<sup>2+</sup> (Ledo, 2000). Además de por Ca<sup>2+</sup>, la unión de DREAM a DRE está modulada por fosforilación y por interacciones proteína-proteína (Mellström, 2001).

DREAM se une al DNA como tetrámero pues se ha comprobado que la proteína de 29 KDa forma un complejo de 110 KDa en torno a DRE (Carrión, 1999). Se ha descrito, además, que la secuencia GTCA forma el núcleo central de la secuencia DRE, mientras que los nucleótidos de alrededor parecen participar notablemente en la afinidad por DREAM (Ledo, 2000).

La des-represión del sitio DRE seguida de la activación de PKA depende de una interacción específica entre  $\alpha$ CREM y DREAM. Dos dominios ricos en leucina (LCD) localizados en el dominio inducible por quinasa (KID) de  $\alpha$ CREM y dos dominios LCD localizados en las posiciones 47 y 155 de DREAM participan en la interacción que deriva en la pérdida de la unión de DREAM a DRE y, consiguientemente, en la des-represión (Ledo, 2002).

Aunque DREAM fue inicialmente asociado a la regulación del gen de *prodinorfina*, existen múltiples genes que presentan la secuencia DRE en la región reguladora 5', como *c-fos*, *ICER* o *calcitonina* (Matsuda, 2006; Ledo, 2000). Además, DREAM es capaz de interactuar con otros factores de transcripción, como TTF-1 (Thyroid-specific transcription factor) para regular la expresión de la *tiroglobulina* (*Tg*) (Rivas, 2004). Por tanto, la des-represión transcripcional mediada por DREAM parece ser el primer paso en la activación transcripcional de muchos genes.

### 2.2.3.- KChIP3 (*K<sup>+</sup> Channel Interacting Protein 3*).

Los canales de potasio dependientes de voltaje se expresan en cerebro y corazón, donde son funcionalmente importantes en el control de la excitabilidad (Hoffman, 1997). Cambios en la expresión de los canales han sido relacionados con epilepsia (Bernard, 2004) y sensibilidad al dolor (Hu, 2006).

Aunque las subunidades  $\alpha$  formadoras de poro de la familia de canales Kv4 generan corrientes de tipo-A en células heterólogas, son necesarias las subunidades " $\beta$ " o "potassium-channel interacting proteins" (KChIP) para la generación de las corrientes de tipo-A nativas. Tras la identificación de las proteínas KChIPs, se observó que estas proteínas co-localizaban con los canales de potasio tipo A, tanto en tejidos como en células en cultivo, y que la co-expresión de KChIP1, KChIP2, calsenilin/DREAM/KChIP3, o CALP/KChIP4 con canales de potasio Kv4.2, Kv4.3 o Kv4.4 provocaba efectos positivos en la electrofisiología de los canales resultantes. Además de una mayor corriente del canal se producía un incremento en la conductancia y una recuperación más rápida de la inactivación. Mutaciones en los motivos de unión de calcio de KChIP3 (mutante EF-hand) conduce a la pérdida del efecto en el aumento de la corriente. El dominio N-terminal de KChIPs no es necesario para la interacción con Kv4 ni para los efectos básicos en las propiedades del canal, pero parece ser el responsable de la variabilidad de los efectos que las distintas isoformas de KChIP ejercen sobre los canales (An, 2000).

Los canales de potasio dependientes de voltaje están constituidos por subunidades  $\alpha$  formadoras del canal y proteínas  $\beta$  auxiliares. Las subunidades  $\alpha$  Kv4 se encuentran retenidas en el retículo y es la unión de las KChIPs al dominio amino terminal de estas subunidades lo que enmascara la señal de retención en el retículo, permitiendo la translocación de las subunidades del canal a la membrana plasmática. Aquí, las KChIPs se encuentran formando parte de un complejo octomérico, que contiene cuatro KChIPs y cuatro subunidades Kv4 (Shibata, 2003) (figura I 5). Las subunidades Kv4 también presentan en la región citoplasmática N-terminal el sitio de unión a  $Zn^{+2}$ , dentro del dominio de tetramerización o dominio T1, conservado entre los canales de potasio Kv. Mutaciones que afectan a la unión del  $Zn^{+2}$  interfieren en las interacciones entre los dominios T1, provocando la retención de las proteínas en el retículo e impidiendo la tetramerización. Las KChIPs son capaces de rescatar la función de estos mutantes del sitio de unión a  $Zn^{+2}$ , conduciendo al mutante a la formación del tetrámero y estabilizando el ensamblaje de los mismos, recuperando el canal (Kunjilwar, 2004).

## 3.- PRESENILINAS.

Las presenilinas (PS) son proteínas transmembrana politópicas originalmente identificadas en ensayos genéticos de familias con la forma autosómica dominante de la enfermedad de Alzheimer (AD). La familia de PS en mamíferos consta de dos proteínas homólogas, PS1 y PS2, que presentan una alta homología de secuencia y que se expresan de forma ubicua en cerebro y en la mayoría de los tejidos. Las PSs son proteínas altamente conservadas presentes en todo el reino animal, tanto en vertebrados como en invertebrados, pero no se han identificado en el genoma de las levaduras (Medina, 2003).

## INTRODUCCIÓN

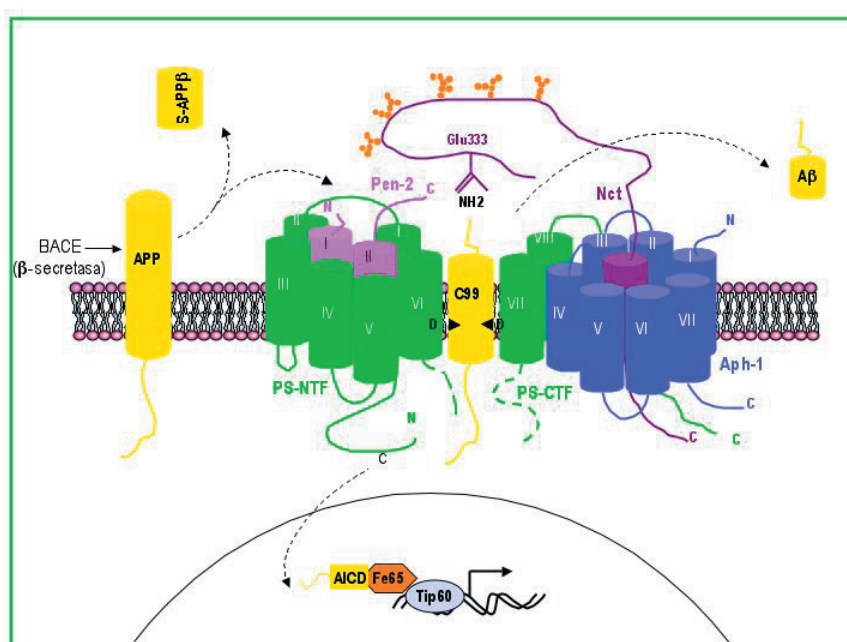
### 3.1.- Estructura del complejo $\gamma$ -secretasa.

Las presenilinas fueron descritas, originalmente, como los únicos componentes de un complejo de alto peso molecular que exhibía actividad  $\gamma$ -secretasa (Yu, 1998; Capell, 1998; Seeger, 1997; Li, 2000; Yu, 2000), actividad implicada en el corte del sustrato dentro de su dominio transmembrana. Sin embargo, en la actualidad, se ha descrito que el complejo  $\gamma$ -secretasa está constituido por, al menos cuatro componentes: presenilina endoproteolizada, nicastrina, Aph-1 y Pen-2 (Edbauer, 2003; Fraering, 2004; Hayashi, 2004; Kimberly, 2003) (figura 17).

#### 3.1.1.- Presenilinas, el sitio activo.

PS1 y PS2 son proteínas de 467 y 448 aminoácidos, respectivamente, cuya topología de membrana ha sido ampliamente debatida (Brunkan, 2005). Usando programas de predicción y mapeo de epítomos, se han propuesto modelos de 6 a 9 dominios transmembrana (TMD), siendo el de 8 el más aceptado (Dewji, 2005; Doan, 1996; Laudon, 2005; Li, 1998; Oh, 2005a; Oh, 2005b; Spasic, 2006). Recientemente, sin embargo, el modelo TMD9, con el extremo C-terminal embebido dentro de la bicapa lipídica, está ganando adeptos (Laudon, H. 2005; Oh, 2005a; Oh, 2005b; Spasic, 2006). Independientemente de la topología, los TMD6 y 7 contienen los residuos aspárticos ácidos catalíticos, que participan en el corte proteolítico de los sustratos (Asp 257 y Asp 385 en los TMD6 y 7 de PS1, respectivamente). Esto hace pensar que PS es, en definitiva, la aspartil-proteasa responsable de la actividad  $\gamma$ -secretasa.

PS sufre un procesamiento endoproteolítico entre los TMD6 y TMD7, por la acción de una metaloproteasa aún sin caracterizar, para generar un fragmento N-terminal (PS-NTF) de ~30 KDa y un fragmento C-terminal (PS-CTF) de ~20 KDa. La holoproteína PS no procesada se degrada rápidamente, mientras que los fragmentos PS-NTF y PS-CTF se asocian establemente formando un heterodímero (relación 1:1) que constituye el sitio activo



**FIGURA 17.- ESTRUCTURA DEL COMPLEJO  $\gamma$ -SECRETASA Y SITIO DE CORTE  $\gamma$ -SECRETASA DEL APP.**

*Estructura del complejo  $\gamma$ -secretasa.* El complejo activo está compuesto por presenilina (PS, verde), Nicastrina (Nct, morado), Aph-1 (azul) y Pen-2 (rosa). Los residuos aspártico catalíticos, Asp257 y Asp385, se localizan en los dominios transmembrana 6 y 7 (VI y VII) de PS, respectivamente. El Glu333 del dominio N-terminal de Nct une el extremo amino-terminal de los sustratos (como APP, amarillo) para posicionarlo en el sitio  $\gamma$ -secretasa activo.

El complejo  $\gamma$ -secretasa cataliza el corte proteolítico de proteínas de membrana de tipo I. La actividad  $\gamma$ -secretasa requiere el corte previo de una  $\alpha$  o  $\beta$ -secretasa, que elimine la mayor parte del dominio extracelular de la proteína.

El segundo corte, dependiente de la actividad  $\gamma$ -secretasa, ocurre dentro de la membrana en una posición próxima a la interfase citosol-membrana y da lugar a la liberación del dominio intracelular (ICD), que en la mayoría de los casos se puede translocar al núcleo para actuar como factor de transcripción. (Modificación de la figura de Dries, 2008).



del complejo  $\gamma$ -secretasa (*Thinakaran, 1996; Thinakaran, 1997; Ratovitski, 1997; Steiner, 1998; Levitan, 2001; Brunkan, 2005*).

Aunque las isoformas PS1 y PS2 comparten un 67% de identidad, con las mayores variaciones en el dominio N-terminal y en el bucle intracelular comprendido entre los TMD6 y 7 (*Stromberg, 2005*), no presentan funciones redundantes. Primero, aunque ambas proteínas están expresadas de forma relativamente ubicua, las dos isoformas presentan algunas especificidades de tejido, con mayor presencia de PS1 en testículos y de PS2 en hígado (*Hébert, 2004*). Segundo, los ratones deficientes ("knockout", K.O.) de PS presentan fenotipos muy diferentes: el ratón K.O. de PS1 es letal en estadio embrionario, mientras el ratón K.O. de PS2 es viable y fértil y sólo presenta fibrosis pulmonar (*Herreman, 1999*). Tercero, estudios celulares han mostrado que, aunque PS1 y PS2 pueden mostrar la misma actividad frente a una batería de sustratos, la redundancia es sólo parcial, porque cada isoforma puede participar en procesos biológicos diferentes (*Lai, 2003*). Cuarto, los ratones transgénicos de PS revelan alteraciones específicas de cada isoforma y mutante, tanto en el procesamiento de APP como en la morfología del esqueleto (*Mastrangelo, 2005*). Sin embargo, por otro lado, PS1 y PS2 son, al menos, parcialmente redundantes a nivel celular pues la reducción en la producción de A $\beta$  (producto del corte  $\gamma$ -secretasa de APP) sólo es completa cuando ambas PSs han sido eliminadas (*Herreman, 1999*) y PS2 puede compensar la falta de función de PS1 en la señal de Notch (*Palacino, 2000*). PS1 parece ser el componente principal en la actividad  $\gamma$ -secretasa, mientras PS2 juega un papel menor, actuando como "válvula de seguridad".

### 3.1.2.- Nicastrina, el receptor del sustrato.

En el año 2000 fue identificado, mediante combinación de ensayos de inmunoprecipitación de PS1 y de espectrometría de masas, un nuevo componente del complejo, Nicastrina (Nct). Es una glicoproteína transmembrana de tipo I de 709 aminoácidos, con un dominio N-terminal extracelular largo glicosilado y un dominio C-terminal intracelular corto (*Yu, 2000*).

La proteína Nct endógena interacciona directa y específicamente tanto con PS1 como con PS2 en el cerebro humano, a través de la parte N-terminal de su dominio transmembrana (*Capell, 2003*). La proteína Nct exógena es, también, capaz de interactuar con varios mutantes de PS, sugiriendo que las alteraciones en la actividad  $\gamma$ -secretasa, asociadas a estos mutantes, no son debidas a la imposibilidad de Nct de unirse a PS (*Yu, 2000*).

Nct parece actuar funcionalmente como receptor del sustrato, pues su extremo N-terminal participa en el reconocimiento del mismo (*Shah, 2005*). El grupo  $\alpha$ -amino del dominio N-terminal libre del sustrato se une a Nct lo que permite su posicionamiento en el sitio activo del complejo  $\gamma$ -secretasa (*Shah, 2005; Kaether, 2004*) (**ver figura 17**).

Similar a PS, Nct sufre un proceso de maduración altamente regulado, necesario para la actividad  $\gamma$ -secretasa (*Arawaka, 2002*). La holoproteína de 78 KDa es N-glicosilada rápidamente en el retículo endoplásmico para dar lugar a una forma "inmadura" de 110 KDa (imNct). Esta imNct es rápidamente degradada (vida media < 6 h.), a no ser que sufra una nueva glicosilación que da lugar a la forma estable (vida media > 24 h.) "madura" (mNct) de 130 KDa, que parece ser la única forma que endógenamente se incorpora al complejo  $\gamma$ -secretasa por unión a PS (*Kimberly, 2002; Yang, 2002; Edbauer, 2002*). Finalmente, mNct adopta una conformación compacta resistente a tripsina por adición de azúcares complejos a su ectodominio (*Shirotani, 2004; Capell, 2005*), que representa la forma activa en el complejo  $\gamma$ -secretasa.

## INTRODUCCIÓN

### 3.1.3.- *Aph-1, el estabilizador.*

En células de mamífero, la proteína Aph-1, de ~30 KDa y de siete dominios transmembrana, se encuentra asociada a PS y Nct, actuando como un regulador del ensamblaje del complejo  $\gamma$ -secretasa. La proteína Aph-1 podría ser importante en el procesamiento de PS y/o en la estabilización y tráfico del complejo  $\gamma$ -secretasa maduro (Takasugi, 2003; Gu, 2003; Hu, 2003; Kim, 2003; Shirotni, 2004) (**figura I 7**).

Aph-1 se une a imNct en el retículo endoplásmico y posteriormente Aph-1-imNct se une a la holoproteína PS. Este complejo ternario imNct-Aph-1-holoPS viaja al trans-Golgi, donde Nct adopta su forma compacta y madura (Niimura, 2005).

### 3.1.4.- *Pen-2, el eje.*

Pen-2 es una proteína de 101 aminoácidos que representa una nueva familia proteica sin dominios o motivos compartidos. Su topología muestra dos dominios transmembrana y los extremos N- y C-terminal orientados hacia el lumen (Francis, 2002) (**figura I 7**).

Distintos estudios han propuesto la participación de Pen-2 en la endoproteólisis de PS, la maduración del complejo  $\gamma$ -secretasa (Takasugi, 2003; La Voie, 2003; Prokop, 2004) y, recientemente, en la modulación de la actividad  $\gamma$ -secretasa, aunque se desconoce el mecanismo (Isoo, 2007).

Pen-2 se incorpora al pre-complejo heterotrimérico imNct-Aph-1-PS en el retículo endoplásmico, uniéndose al TMD4 de PS. La unión de Pen-2 permite la endoproteólisis de PS y la salida del complejo  $\gamma$ -secretasa del retículo al Golgi, donde la Nct puede madurar completamente antes de moverse a otras localizaciones (endosomas, membrana plasmática, etc.).

### 3.1.5.- *Otras proteínas.*

Trabajos recientes sugieren que otras proteínas podrían interactuar con el complejo y regular su función.

La glicoproteína de membrana de tipo I CD147 co-purifica con  $\gamma$ -secretasa en líneas celulares humanas. La reducción de los niveles de CD147 usando el RNA interferente (RNAi) aumenta la producción del péptido A $\beta$ , sugiriendo que esta proteína también participa en la modulación de la actividad  $\gamma$ -secretasa (Zhou, 2005).

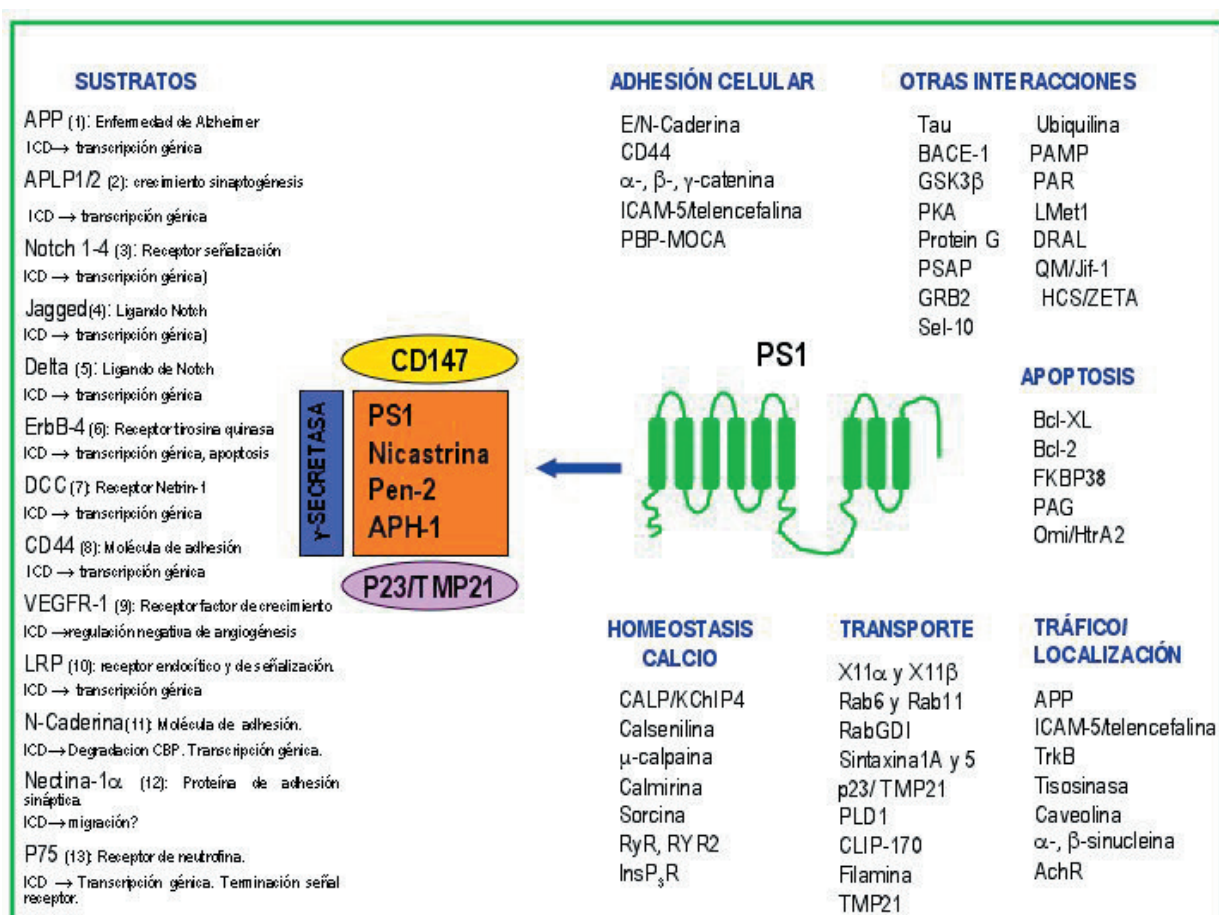
Se ha descrito que la proteína TMP21 regula el corte  $\gamma$ -secretasa del APP sin afectar al corte  $\epsilon$  próximo a la interfase citosol-membrana, que permite la liberación del dominio intracelular del APP (AICD) en el citosol (Chen, 2006).

También se ha visto recientemente que el receptor Rer1p se une a imNct y compite con Aph-1. Rer1p podría regular el ensamblaje de  $\gamma$ -secretasa en el retículo endoplasmático y en el Golgi temprano (Spasic, 2007). Sin embargo, otros estudios muestran Rer1p interactuando con Pen-2 (Kaether, 2007).

Estos datos requieren confirmación, pero el estudio de las proteínas que interactúan y regulan el complejo  $\gamma$ -secretasa es interesante para la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas.

### 3.2.- Funciones de las presenilinas.

Un gran número de funciones diferentes han sido asignadas a PS, incluyendo la modulación de la susceptibilidad de las neuronas a apoptosis (Vito, 1996; Wolozin, 1996; Kim, 1997; Loetscher, 1997; Grunberg, 1998), homeostasis del  $\text{Ca}^{+2}$  (Leissring, 2000; Choi, 2001; Zaidi, 2002; Jo, 2003), respuesta celular al plegamiento incorrecto de proteínas ("unfolded protein response" UPE), adhesión celular, el tráfico de membrana de distintas proteínas y la actividad  $\gamma$ -secretasa sobre APP y otros sustratos (rev. en Brunkan, 2005; Hass, 2008) (figura 18).



**FIGURA 18.- FUNCIONES DE PRESENILINA.**

Resumen de las distintas funciones celulares en las que se ha implicado a PS1 como componente o no de la actividad  $\gamma$ -secretasa. Como parte del complejo  $\gamma$ -secretasa, PS1 corta proteínas de membrana de tipo I dando lugar a un fragmento intracitoplasmático (ICD) que, aunque generalmente se transloca al núcleo para actuar como factor de transcripción, puede desempeñar otras funciones ((1) Xu, 2007; (2) Pardossi-Piquard, 2005; (3) Bray, 2006; (4) y (5) LaVoie, 2003; (6) Lee, 2002; (7) Taniguchi, 2003; (8) Okamoto, 2001; (9) Boulton, 2008; (10) May, 2002; (11) Marambaud, 2003; (12) Kim, 2002; (13) Kanning, 2003). Además, PS1 interacciona con múltiples proteínas implicadas en funciones fisiológicas importantes como la homeostasis del calcio, el transporte vesicular, la adhesión celular, la apoptosis, etc. (Modificación de la figura de Vetrivel, 2006).

#### 3.2.1.- Actividad $\gamma$ -secretasa.

La importancia de presenilina/complejo  $\gamma$ -secretasa radica en que fue inicialmente identificada como la enzima implicada en la generación de la proteína  $\beta$ -amiloide, cuya forma aberrante es el principal componente de las placas seniles presentes en los cerebros de enfermos de Alzheimer.

## INTRODUCCIÓN

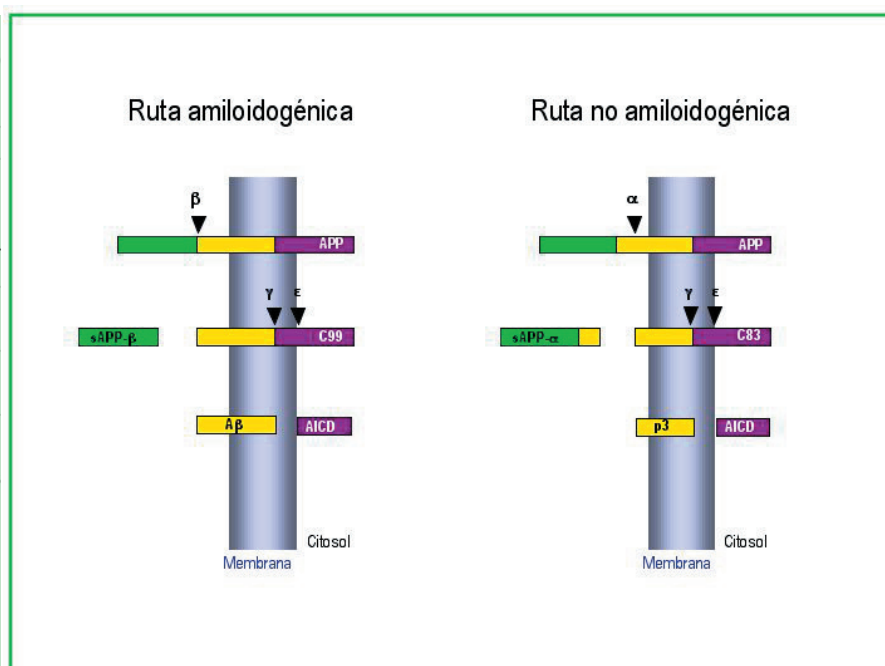
El corte  $\gamma$ -secretasa se produce en el dominio transmembrana del sustrato, lo que implica que la reacción enzimática que cataliza este corte proteolítico está localizada dentro de la bicapa lipídica. Este tipo de procesamiento ha sido sugerido como el mecanismo general para la transducción de señales y se conoce como proteólisis intramembrana regulada (RIP) (*Brown, 2000*). Más de 60 proteínas de membrana tipo I, como APP, Notch, ErbB4, Caderinas, CD44, LRP, Nectina-1, Ire- $\alpha$ , etc. sufren RIP dependiente de PS (**figura I 8**).

PS/ $\gamma$ -secretasa no puede cortar directamente proteínas de tipo I, necesita que primero tenga lugar la eliminación del ectodominio del sustrato. Este primer corte es llevado a cabo por proteasas asociadas a membrana de las familias BACE y ADAM o por aspartil-proteasas como BACE-1. En la mayoría de los casos, el segundo corte, dependiente de la actividad  $\gamma$ -secretasa, ocurre dentro de la membrana en una posición próxima a la interfase citosol-membrana. El factor principal que modula el corte  $\gamma$ -secretasa parece ser la longitud del fragmento extracelular originado tras el primer procesamiento, más que la secuencia de aminoácidos específica o los dominios de reconocimiento de sustrato. Finalmente, en la mayoría de los casos tiene lugar la liberación del dominio intracelular (ICD), que se transloca al núcleo, donde presumiblemente podría actuar como factor de transcripción (revisado en *Medina, 2003; Parks, 2007*), como en el caso del APP (**figura I 7 e I 9**).

### FIGURA I 9.- PROCESAMIENTO DE APP.

Esquema del procesamiento proteolítico amiloidogénico y no amiloidogénico de APP.

El corte amiloidogénico (iniciado por  $\beta$ -secretasa) de APP permite generar el péptido A $\beta$  (figura izquierda), mientras que el corte no amiloidogénico ( $\alpha$ -secretasa) da lugar a un fragmento más pequeño denominado p3 (figura derecha). El fragmento AICD, obtenido en ambos casos tras el corte  $\gamma$  y/o  $\epsilon$ -secretasa, viajará al núcleo para actuar como factor de transcripción.



#### 3.2.1.1.- Modulación de la actividad $\gamma$ -secretasa.

No se conoce mucho acerca de cómo se regula la actividad de PS dentro del complejo  $\gamma$ -secretasa pero, en los últimos años, se han llevado a cabo varios estudios.

Uno de los mecanismos de modulación del complejo  $\gamma$ -secretasa parece ser la fosforilación. *Kirschbaum y cols. (2001)* describieron que la fosforilación de PS1 por GSK-3 $\beta$ , en las Ser353 y Ser357 localizadas dentro de su bucle citoplasmático, favorecía la degradación del fragmento PS1-CTF producido en exceso, contrario al

efecto producido por la fosforilación por Cdk5 (Lau, 2002). La fosforilación por GSK3 $\beta$  parece, además, modular diferencialmente el corte de los sustratos  $\gamma$ -secretasa pues provoca una disminución del corte  $\epsilon$  de N-caderina, que reduce la producción del fragmento N-cad-CTF2, sin afectar significativamente al del APP (Uemura, 2007). Se ha visto también que CK1 (casein kinase 1) actúa directa o indirectamente en la actividad  $\gamma$ -secretasa para interferir selectivamente en el corte  $\gamma$  del APP sin afectar al corte de Notch (Flajolet, 2007). Además, la fosforilación del dominio bucle citoplasmático de PS1 por PKA y PKC (Ser346), dentro del motivo reconocido por caspasas, regula el procesamiento proteolítico de PS1 por caspasa y la progresión de la apoptosis (Fluhrer, 2004). Recientemente se ha descrito que TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) estimula potencialmente la actividad  $\gamma$ -secretasa a través de la fosforilación en serina/treonina de PS1 (Ser319 y Thr320) y Nct por JNK (c-Jun N-terminal Kinase) (Kuo, 2008).

Por otro lado, factores ambientales y el estrés también parecen actuar como moduladores de la actividad  $\gamma$ -secretasa (Ni, 2006).

Por último, PS interacciona con múltiples proteínas que podrían modular su función  $\gamma$ -secretasa o inducir su participación en otras actividades celulares. Dentro del interactoma de PS se han identificado proteínas de la familia armadillo como  $\beta$ -catenina, proteínas de adhesión celular como las caderinas, moléculas pro-apoptóticas Bcl-X<sub>L</sub>, proteínas implicadas en tráfico/ localización como caveolina, APP y sinucleína, Rab11 y Rab6 (GTPasas involucradas en regulación del transporte vesicular), proteína G (Go) del cerebro, GSK-3 $\beta$ , PKA, proteínas de unión a calcio como calsenilina, etc. (Van Gassen, 2000, Hass, 2008)(Figura I 8).

### 3.2.2.- Actividad de presenilina independiente del complejo $\gamma$ -secretasa.

Una serie de estudios han sugerido que PS puede mediar funciones que son independientes de su actividad proteolítica, entre las que cabría destacar el papel de PS en la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> (LaFerla, 2002; Leissring, 2002), a través de interacciones con numerosos reguladores celulares del flujo de calcio o con proteínas sensoras de calcio. Así la des-regulación de la señal de calcio ha sido propuesta como uno de los mecanismos implicados en el efecto pro-apoptótico de las mutaciones de PS1 y PS2 asociadas a la enfermedad de Alzheimer (Popescu, 2004).

Por otro lado, PS interacciona con y regula la proteína  $\beta$ -catenina. La reducción de la interacción PS1/ N-caderina/ $\beta$ -catenina provoca la inhibición de la señal de supervivencia celular PI3K-Akt mediada por contacto y la regulación diferencial del corte de sustratos por PS/  $\gamma$ -secretasa (Uemura, 2007). Además, se ha descrito que PS regula el metabolismo de  $\beta$ -catenina en la ruta de Wnt (Prager, 2007).

También se ha descrito el posible papel de PS en la regulación del tráfico de diversas proteínas de membrana de forma independiente de su actividad  $\gamma$ -secretasa. (Scheper, 2004; Annaert, 2001; Morfini, 2002).

Por último, se ha sugerido que PS puede modular directamente la apoptosis a través de su interacción con miembros anti-apoptóticos de la familia de Bcl-2 (Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub>) (Alberici, 1999; Passer, 1999) o, como ya hemos discutido previamente, a través de su efecto en la homeostasis del calcio, en la producción del péptido A $\beta$  o en la activación de la ruta de supervivencia PI3K/Akt (figura I 8).



### 4. RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE HEDGEHOG (Hh).

El gen *Hedgehog* (Hh) de *Drosophila* recibe su nombre del fenotipo de la larvas mutantes deficientes para el gen, que debido a la disposición de los dentículos, recuerda el aspecto de un erizo (*Nüsslein-Volhard, 1980*). La proteína Hh es un morfógeno pues es una molécula de señalización intercelular que tienen la capacidad de señalizar a larga distancia de forma dependiente de la concentración (*Ingham, 2001*).

La ruta de señalización de Hh regula múltiples aspectos del desarrollo embrionario tanto en vertebrados como en invertebrados, jugando también un papel importante en la mantenimiento de la regulación de cierto tipo de células madres en el organismo adulto. Una señal de Hh reducida provoca alteraciones del desarrollo humano como polidactilia y holoprosencefalia, así como severas malformaciones craneofaciales y del esqueleto (*McMahon, 2003*). Por el contrario, la activación constitutiva de la ruta está implicada en la formación de carcinoma celular basal y meduloblastoma y en la incidencia de un número creciente de cánceres (*Beachy, 2004*).

#### 4.1.- Componentes de la ruta de señalización de Hh.

Aunque la mayoría de los elementos de la ruta están conservados en invertebrados y vertebrados, la principal diferencia radica en el número de genes relacionados presentes en cada organismo. Por ejemplo, en moscas la proteína Hedgehog (Hh) está codificada por un único gen (*Hedgehog, Hh*) mientras en vertebrados existen tres genes relacionados, *Sonic Hedgehog (Shh)*, *Desert Hedgehog (Dhh)* e *Indian Hedgehog (Ihh)*. En la ruta de Hh participan, principalmente, el ligando Hedgehog (Hh), el transportador del ligando Dispatched (Dsp, proteína de doce dominios transmembrana), el receptor Patched (Ptc, proteína de doce dominios transmembrana), el transductor de la señal Smoothened (Smo, proteína de siete dominios transmembrana), los reguladores citoplasmáticos Costal 2 (Cos2, miembro de la familia de las quinesinas), Fused (Fu, Ser/Thr quinasa) y Supresor de Fused (SuFu, regulador negativo), los reguladores de Smo y/o de Ci PKA (Ser/Thr quinasa), CKI (Ser/Thr quinasa) y GSK3 (Ser/Thr quinasa) y el factor de transcripción Cubitus interruptus (Ci, factor de transcripción *dedos de Zn*) (*Hooper, 2005; Ruiz-Gómez, 2007; Aikin, 2008*).

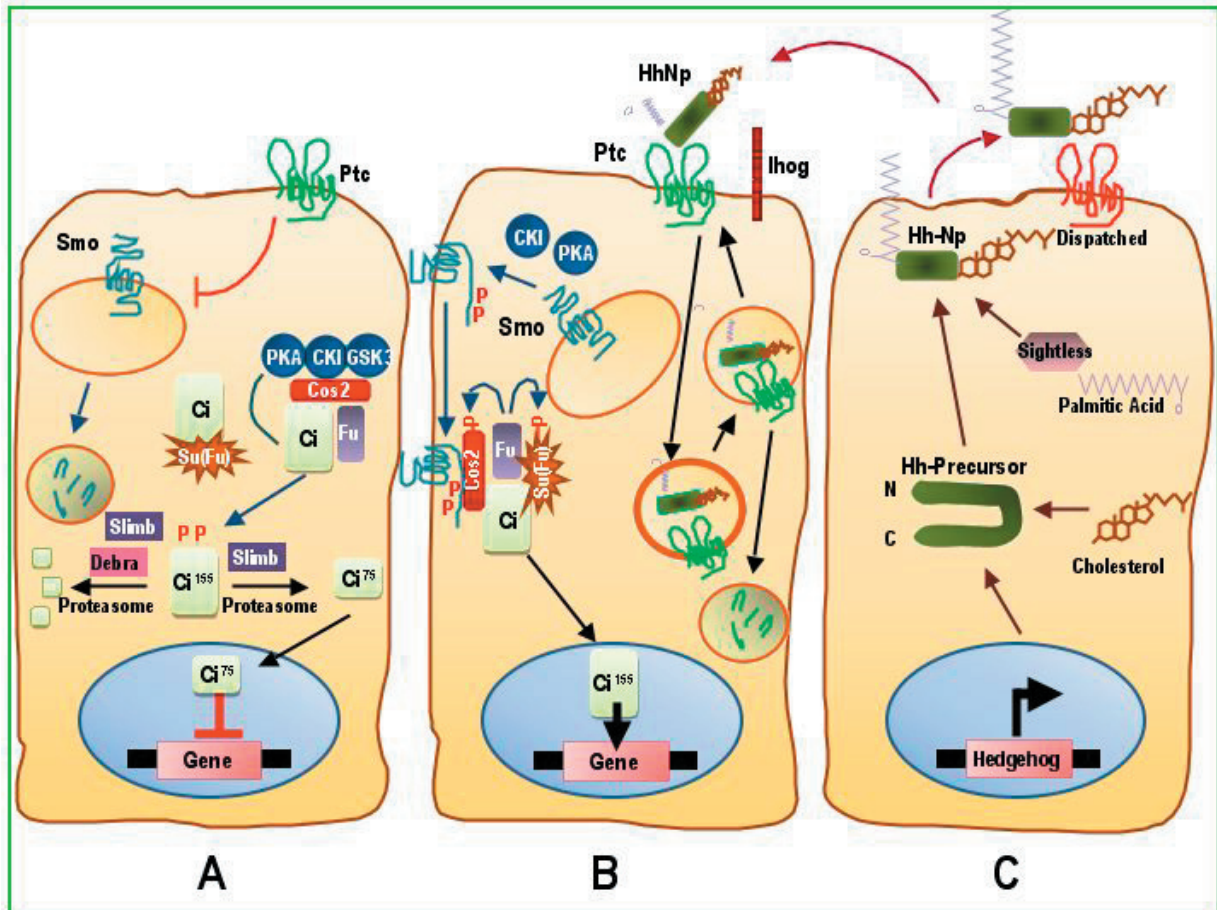
#### 4.2.- Mecanismo de la ruta de señalización de Hh.

El ligando Hh es secretado al medio extracelular tras sufrir una serie de modificaciones post-traduccionales (*Hooper, 2005*) (**figura I 10C**). Hh se sintetiza como un precursor de 45 kDa que sufre una hidrólisis intramolecular catalizada por su extremo carboxilo terminal, generando dos fragmentos proteolíticos: uno amino-terminal de 19 kDa, que posee toda la actividad del ligando y al que se denomina HhN, y otro carboxilo-terminal de 25 kDa. Asociado a la hidrólisis del precursor, por parte del extremo carboxilo terminal de la proteína, se produce la unión covalente de una molécula de colesterol al extremo C-terminal de HhN, generando el HhNp (p de procesado) (*Torroja, 2005*) y, a continuación, la O-acil-transferasa Sightless o Rasp cataliza la palmitoilación en el extremo N-terminal (*Lee, 2001; Micchelli, 2002*). La adición de estos dos residuos lipídicos repercute enormemente en multitud de aspectos como la localización, secreción, difusión y actividad de la proteína Hh.

La secreción de Hh necesita de la participación de Dispatched (Disp 1 y 2 en vertebrados). Disp es una proteína integral de membrana de 12 TMD que facilita la salida de Hh al espacio extracelular, funcionando como un transportador específico de Hh, al menos en *Drosophila* (*Burke, 1999; Amanai, 2001*).

En el movimiento de HhNp en el medio extracelular participan macromoléculas de la matriz extracelular como el proteoglicano heparan-sulfato. En *Drosophila*, la difusión requiere de la participación de la

glicosaminoglicano-transferasa tout-vela, cuyos homólogos en vertebrados son miembros de la familia de las glicosaminoglicano-transferasas Exotoxinas (EXT). Otros factores que podrían facilitar la difusión de HhNp son la formación de complejos multiméricos y la asociación a lipoproteínas. Se ha sugerido que las moléculas de HhNp podrían formar complejos multiméricos en los que los residuos hidrofóbicos se dispondrían en el interior, formando una especie de micela. Las formación de estos complejos, para lo que las moléculas de Hh tiene que tener las dos modificaciones lipídicas, facilitaría la solubilidad y difusión de Hh en el medio extracelular (Zeng, 2001, Chen, 2004; Gallet, 2006).



**FIGURA I 10.- MECANISMO DE LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE HEDGEHOG.**

A) Estado de la ruta en una célula receptora no estimulada por Hh. En ausencia de Hh, Ptc inhibe a Smo y lo conduce a degradación. El factor de transcripción Ci es fosforilado por el complejo Cos2/Fu/Quinasas Ser/Thr (PKA, CKI, GSK3) lo que induce su degradación parcial o total, impidiendo que tenga lugar la transcripción de los genes diana.

B) Célula receptora estimulada por Hh. La unión del ligando a Ptc bloquea la represión de éste sobre Smo. Smo activado recluta al complejo Ci.

C) Modificaciones post-traduccionales que sufre el ligando hedgehog antes de ser secretado a la matriz extracelular, por acción de Dispatched (Disp).

El receptor de Hh en *Drosophila* es Patched (Ptc), habiendo dos homólogos en vertebrados (Ptc1, y Ptc2). Ptc es una proteína integral de membrana que, como Disp, presenta 12 dominios transmembrana.

En *Drosophila*, cuando la célula receptora no es estimulada por el ligando Hh (**figura I 10A**), Ptc se encuentra inhibiendo al receptor de 7 dominios transmembrana Smoothed (Smo), emparentado con la familia de receptores Frizzled de Wnt. El mecanismo por el que Ptc está inhibiendo a Smo todavía no se ha determinado,

## INTRODUCCIÓN

pero se sabe que no hay interacción entre ambas proteínas. El factor de transcripción Cubitus interruptus Ci (Gli 1, 2 y 3 en vertebrados), diana final de la ruta, se encuentra, en ausencia de Hh, formando parte de un complejo proteico asociado a microtúbulos, junto con Costal 2 (Cos2), Fused (Fu), Suppressor of Fused (SuFu), la proteínas quinasas A, GSK3 $\beta$  y CKI que retienen y fosforilan a Ci (155 kDa) y median su ubiquitilación o poli-ubiquitilación por la ubiquitin-ligasa Slimb (Smelkinson, 2006) o Debra (Dbr) (Dai, 2003), respectivamente. De manera que Ci es convertido en la forma represora de 75 KDa (Ci<sup>75</sup>) (porción amino-terminal), que entra en el núcleo y reprime la transcripción de los genes diana, o es degradado por la vía del proteasoma. Por otro lado, Ci<sup>155</sup> forma un complejo Ci<sup>155</sup>/SuFu que mantiene al factor de transcripción retenido en el citoplasma (Stegman, 2000), no pudiendo entrar en el núcleo.

Tras la unión de Hh a Ptc (**figura I 10B**) se produce la internalización vía dinamina del complejo Ptc-Hh a endosomas y su posterior degradación por lisosomas (Torroja, 2004; Gallet, 2005) y la liberación de la inhibición que Ptc ejerce sobre Smo, permitiendo un cambio de su localización celular desde vesículas intracelulares a la membrana plasmática donde se inicia la señalización. En *Drosophila*, Smo es fosforilado por quinasas Ser/Thr (PKA y CKI) y se produce la acumulación de Smo fosforilado en membranas celulares basolaterales (Lum, 2004; Kalderon, 2005). Esta fosforilación hace que Smo pase de una *conformación cerrada*, debida a las interacciones electroestáticas que se establecen entre los dominios de Arg presentes en su cola citoplasmática, a una *conformación abierta* en la que la cola citoplasmática es capaz de dimerizar y reclutar al complejo Cos2 a la membrana (Zhao, 2007). Esto induce la fosforilación de Cos2 y SuFu por la quinasa Fu (Nybakken, 2002), el desensamblaje del complejo y evita que Ci sea fosforilado, impidiendo que sea degradado en su forma Ci<sup>75</sup> y permitiendo la estabilización de la forma Ci<sup>155</sup> en el citoplasma, su entrada en el núcleo y la activación de la transcripción (Jia, 2003; Ruel, 2003; Stegman, 2004; Ogden, 2003; Zhu, 2003; Lum, 2003) de genes como *dpp* (decapentaplegic), *ptc* (patched), *En* (engrailed), *col* (collier) e *iro* (iroquois), entre otros.

En vertebrados, la maquinaria proteica necesaria para la recepción y transducción de la señal de Shh se localiza en una organela especializada denominada cilio primario. Éstos son cilios pequeños e inmóviles que se localizan en todas las células epiteliales y estromales de mamíferos y que actúan como sensores en muchos tejidos (revisado en Michaud, 2006).

En ausencia de Shh, Ptc1 se concentra en el cilio e inhibe la actividad de Smo (Rohatgi, 2007). Shh unido a Ptc1 inactiva al receptor y hace que Ptc1 salga del cilio, por acción de la proteína motora dineina. Esto permite la activación de Smo, que por acción de Kif-3A (homólogo de Cos2), entra en el cilio y se acumula en la membrana ciliar (Corbit, 2005) (revisado en Rohatgi, 2008), donde se inicia la transmisión de la señal.

### 4.3.- Smoothened como un miembro de la familia de GPCRs.

Tanto el receptor Fz como Smo presentan similitudes de secuencia significativas a los GPCRs de la subfamilia de secretina, particularmente en sus dominios transmembrana (Barnes, 1998; Foord, 2002). Smo presenta un dominio N-terminal extracelular largo y un dominio conservado rico en cisteínas (CRD). En el receptor Fz este dominio parece estar implicado en el reconocimiento de su ligando (Dann, 2001) mientras que en Smo, incapaz de interaccionar directamente con Hh, es necesario para la adquisición de la estructura terciaria (Nusse, 2003; Stone, 1996). La estructura de 7 dominios transmembrana de Smo y el hecho de que el tercer bucle citoplasmático y el séptimo dominio transmembrana sean necesarios para la transducción de la señal, sugieren la posibilidad de que Smo pueda interaccionar con proteínas G heterotriméricas. Sin embargo, al comienzo de esta tesis había pocas evidencias de que la transducción y regulación de la señal de Smo tuviese parecido con la de otros GPCRs.



## 5.- *DROSOPHILA MELANOGASTER*, ORGANISMO MODELO PARA ESTUDIAR EL DESARROLLO.

*Drosophila* se utiliza como organismo modelo para el estudio de la genética del desarrollo por varias razones: tiene un ciclo de vida corto, en el que se produce una elevada descendencia, es fácil de mantener y el conocimiento de su genética está muy avanzado, incluida la secuenciación de su genoma. Pero, sin duda, la principal ventaja es que la mayoría de los genes claves para su morfogénesis están conservados evolutivamente; el 50 % de las secuencias proteicas de la mosca corresponden a proteínas homólogas en los mamíferos, lo que ha permitido avanzar en el estudio molecular de muchas vías de señalización implicadas en el desarrollo de las mismas.

### 5.1.- Ciclo vital.

*Drosophila melanogaster* es un insecto con metamorfosis completa (holometábolo), cuyo ciclo biológico se divide en cuatro estadios: embrión, larva, pupa y adulto o imago (**figura I 11**).

Durante la embriogénesis (0-24 horas después de la puesta) el cigoto pasa de ser una célula única a una larva móvil. La larva pasa por tres periodos larvares, los dos primeros duran 24 horas cada uno y el tercero dura dos días. Aproximadamente 120 horas después de la puesta, la larva deja de alimentarse y tiene lugar la pupación. A continuación, ocurre la metamorfosis, periodo de cuatro días de duración que dará lugar al individuo adulto o imago (Ashburner, 1989; Lawrence, 1992).

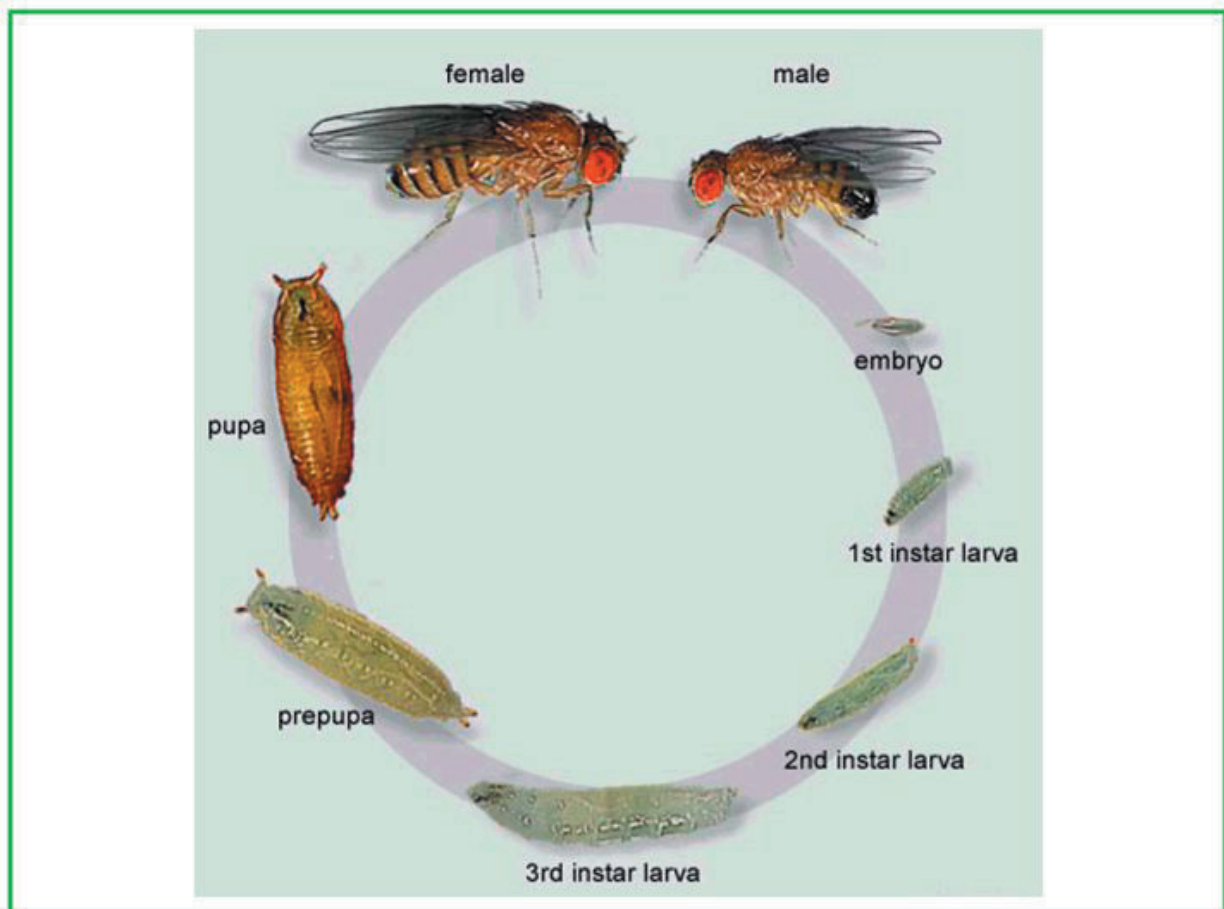
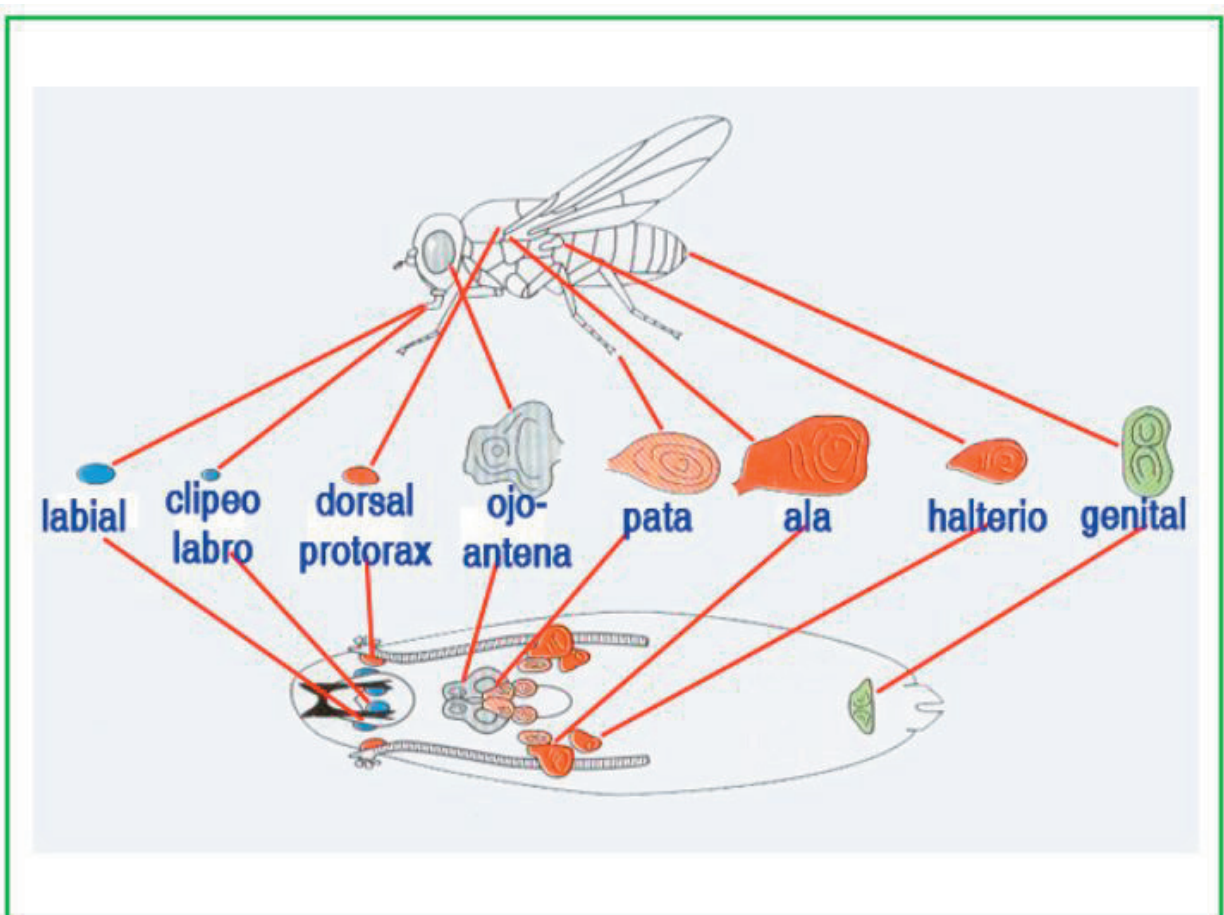


FIGURA I 11.- CICLO DE VIDA DE *Drosophila*. Tomada de *Developmental Biology*. 7ª Edición. S. F. Gilbert. 2003.

### 5.2.- El disco imaginal del ala como modelo experimental.

Las estructuras cuticulares adultas (cabeza, tórax, alas, patas, genitalia, analia) se forman a partir de grupos celulares precursores, determinados en la embriogénesis, que se denominan discos imaginales. En la larva de *Drosophila* hay nueve discos imaginales más un disco genital (**figura I 12**).



**FIGURA I 12.- DISCOS IMAGINALES.** La figura muestra la correspondencia de los discos imaginales con las estructuras adultas que forman (tomada de *Alberts, 1994*, con modificaciones).

En este trabajo nos hemos centrado, en colaboración con el grupo del Dr. J. F. De Celis (CBMSO), en el estudio del disco imaginal de ala, que da lugar a la mayor parte del tronco y del ala. El uso del disco imaginal de ala ha permitido el estudio de la formación de patrones morfológicos durante el desarrollo. La caracterización de los mecanismos genéticos y moleculares que intervienen en este proceso ha sido clave para identificar los genes y las vías de señalización implicadas, cuya función está conservada también durante el desarrollo de vertebrados.

En el epitelio del disco imaginal se distinguen dos subdivisiones (**figura I 13**): una que dará lugar a un compartimento anterior (A) y otro posterior (P) y otra subdivisión que dará un compartimento dorsal (D) y otro ventral (V). Estos compartimentos estarán separados por sus respectivos bordes de restricción de linaje (*Dahmann, 1999; Tabata, 2004*). Además, existe una tercera división a lo largo del eje próximo-distal (P/D) entre el territorio notum y el ala, pero el borde notum-ala no es un borde de compartimento ya que no existe una restricción de linaje (*Wang, 2000; Zecca, 2002a; Zecca, 2002b*).

### 5.2.1.- Especificidad del eje Dorso-Ventral (figura I 13A y B).

En la fase temprana del desarrollo del primordio del ala, cuando está formado por un pequeño grupo de unas 100 células, el gen selector *apterous* (*ap*) se expresa en las células dorsales por la actividad de la vía EGF-R (Blair, 1994; Diaz-Benjumea, 1993). La expresión de Ap en las células D activa la expresión del ligando de Notch, Serrate (Ser), y de una proteína glicosiltransferasa, Fringe (Fng) y, por otra parte, restringe la expresión de Delta (Dl), un segundo ligando de Notch, a las células V (De Celis, 1996; Diaz-Benjumea, 1995; Doherty, 1996; Irvine, 1994; Milan, 2000). La diferente capacidad de respuesta del receptor Notch en los compartimentos opuestos asegura la activación de la vía de Notch exclusivamente en las células del borde D/V.

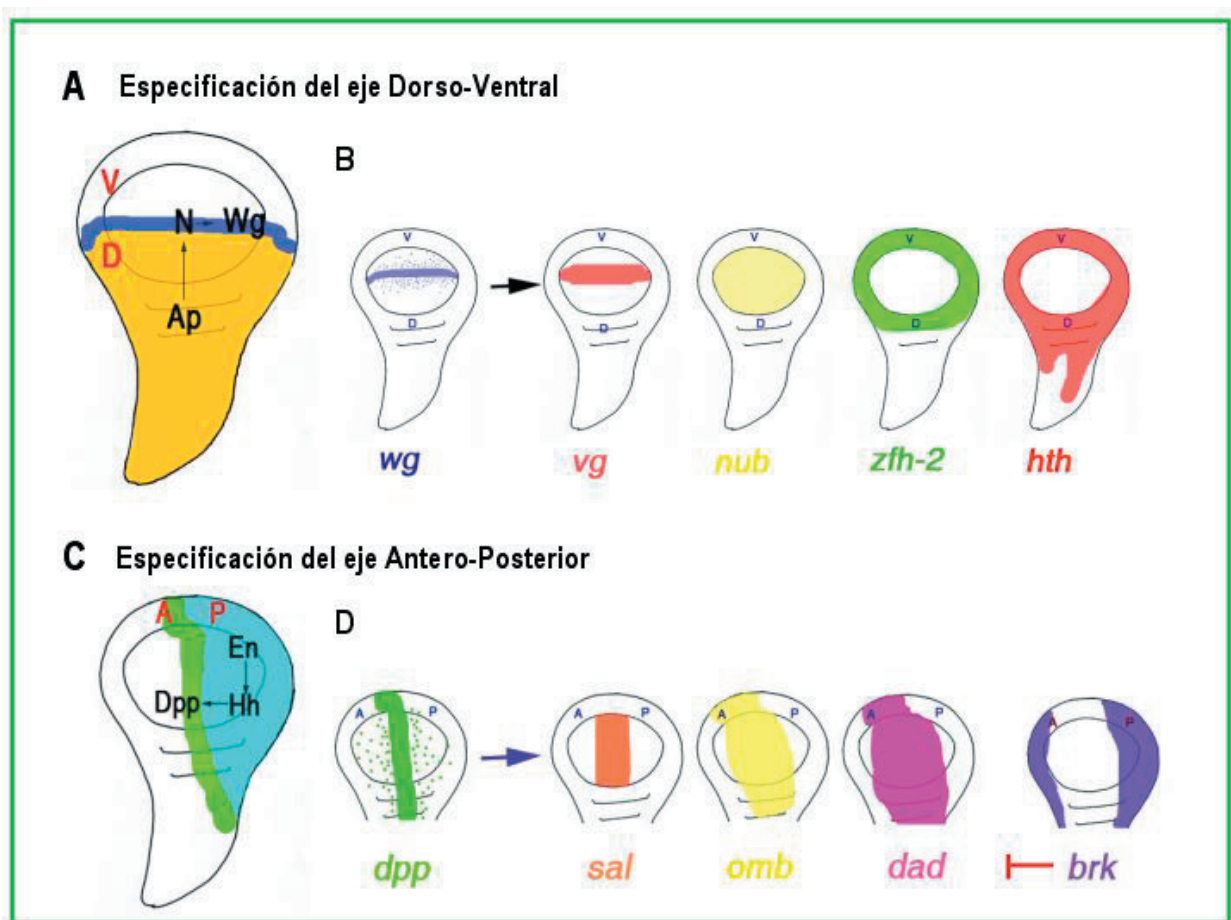


FIGURA I 13.- ESQUEMA DE LAS DIVISIONES DEL DISCO IMAGINAL DEL ALA.

A) Representación de los compartimentos D y V. En el compartimento D, la expresión del gen *ap*, genera un borde de compartimento donde se activa la vía de Notch mediante señales de corto alcance. Notch activa en estas células la expresión de *Wg* (Wingless), que actúa como un morfógeno de largo alcance.

B) Representación de los genes activados en el eje D/V en respuesta a la señal mediada por Ap.

C) Representación de los compartimentos A y P. En el compartimento P, la expresión del gen selector *En*, induce la expresión de la proteína *Hh*. *Hh*, a su vez, induce la expresión de *Dpp* en una estrecha banda de células A, actuando como morfógeno de largo alcance e induciendo el crecimiento del ala.

D) Representación de los genes activados en el eje A/P en respuesta al gradiente de *Dpp*.

### 5.2.2.- Especificidad del eje Antero-Posterior (figura I 13C y D).

La identidad de las células del compartimento P está determinada por la expresión del gen selector *Engrailed* (*En*), que codifica un factor de transcripción (Kornberg, 1985; Morata, 1975). En induce la expresión de la proteína Hedgehog (Hh) en las células P (Tabata, 1992) y reprime la expresión de la proteína Cubitus interruptus (Ci) (Eaton, 1990), un efector esencial de la vía de Hh. La proteína Hh actúa como un morfógeno de corto alcance e induce la expresión de la proteína difusible Decapentaplegic (Dpp), en una línea estrecha de células A. Este grupo de células que expresan Dpp, a lo largo del eje A/P, constituye un centro organizador (revisado en Methot, 1999).

## OBJETIVOS



A la luz de las nuevas funciones atribuidas en los últimos años a GRKs, nos propusimos la búsqueda de nuevas proteínas de interacción y/o sustratos de estas quinasas.

### **1.- Búsqueda de nuevas interacciones de GRKs en base a datos bibliográficos.**

En base a resultados previos que señalaban que proteínas de unión a calcio modulaban GRKs y a datos preliminares que apuntaban a DREAM/calsenilina/KChIP3 como una nueva proteína de interacción con GRK2, nuestro primer objetivo fue la caracterización de la posible interacción y modulación de DREAM y GRK2. Los datos obtenidos nos llevaron posteriormente a extender este estudio a Presenilina 1, proteína que a su vez interacciona con DREAM.

### **2.- Caracterización fenotípica de la falta de función de quinasas GRKs en el modelo de *Drosophila*.**

Generación de una línea transgénica de *Drosophila melanogaster* que exprese el RNA interferente para Gprk2 (homólogo de GRK4, 5 y 6 en la mosca) bajo el control del promotor pUAS. Caracterización de los efectos fenotípicos por falta de función de GRKs en el disco de ala, para la identificación de procesos fisiológicos en los que esté implicada esta quinasa.





## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1.- REACTIVOS

Todos los reactivos y productos utilizados son de grado analítico. Cloruros sódico, potásico y magnésico, carbonatos sódicos, hidróxido sódico, sacarosa, formaldehído, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, acetona, metanol, etanol, butanol, ácido acético glacial y glicerol fueron suministrados por Merck.

Tris, Bis-Tris, Bicina, Glicina, ATP, floruro sódico, ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA), ácido etilen-glicol-bis-β-aminoetileter-N,N'-tetraacético (EGTA), β-mercaptoetanol, ditioneitol (DTT), heparina, ortovanadato sódico, dimetilsulfóxido (DMSO), rojo Ponceau, HEPES, Nonidet P-40, Tritón X-100, CHAPSO 98%, Tween-20, aporinina, azida sódica y proteína-A sefarosa fueron suministrados por SIGMA.

La proteína G-sefarosa se obtuvo de Zymed.

Lipofectamina y Cellfectina fueron suministrados por Invitrogen.

Fenil-metil-sulfonil-floruro (PMSF), benzamidina, inhibidor de tripsina de soja (STI), isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG), glutatión reducido y albúmina de suero bovina (BSA) se obtuvieron de Boehringer Mannheim.

N, N, N', N'-tetrametil-etilen-diamina (TEMED), dodecilsulfato sódico (SDS), persulfato amónico, azul de bromofenol, azul brillante de Coomassie, patrones de peso molecular conocido, papel de nitrocelulosa y el reactivo de Bradford fueron proporcionados por Bio-Rad.

El reactivo de Folin-Ciocalteu se obtuvo de Panreac.

La Glutatión-sefarosa fue suministrada por Pharmacia-LKB.

El isótopo radiactivo [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP fue proporcionado por Amersham Biosciences y la mezcla de marcaje metabólico [ $^{35}\text{S}$ ]metonina-cisteína fue suministrada, en un principio, por New England Nuclear y, en la actualidad, por Perkin Elmer.

Se han utilizado además una serie de productos más específicos cuya procedencia se reseña en el texto.

## 2.- MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

### 2.1.- Amplificación de DNA (PCR).

Se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando un DNA determinado como molde, la enzima Taq polimerasa (BIOLINE) y la temperatura de hibridación adecuada para cada par de oligos (ver apartado 15.1 de Current Protocols in Molecular Biology).

### 2.2.- Amplificación de DNA a partir de colonias bacterianas (PCR de colonias).

Este método se utiliza generalmente para identificar clones positivos. La amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en 2.1 pero, en lugar de utilizar

## MATERIALES Y MÉTODOS

como molde un cDNA o un DNA plasmídico purificado, se utilizó la propia colonia bacteriana transformada con el plásmido de interés ([http://www.mcdb.lsa.umich.edu/labs/maddock/protocol/PCR/colony\\_pcr.html](http://www.mcdb.lsa.umich.edu/labs/maddock/protocol/PCR/colony_pcr.html)).

### 2.3.- Digestiones enzimáticas.

Todas las digestiones se realizaron a 37°C en un volumen que varía desde 10 µl a 50 µl y con 3-30 unidades de enzima de restricción, durante al menos 2 horas, según las recomendaciones de la casa comercial. La mayoría de las enzimas empleadas fueron suministradas por New England Biolabs.

### 2.4.- Ligación.

Las ligaciones se realizaron con la enzima DNA Ligasa de T4 (New England Biolabs), siguiendo el protocolo de la casa comercial y empleando la relación estequiométrica inserto:vector necesaria en cada caso.

### 2.5.- Mutagénesis dirigida.

Los mutantes fueron generados mediante el protocolo de mutagénesis dirigida de QuickChange de Stratagene. Resumidamente, se diseñaron los oligos complementarios con la mutación a introducir, que se utilizaron como cebadores en la PCR, de acuerdo con las características recomendadas por la casa comercial, y que se reseñan para cada mutante en particular. Los productos amplificados se digirieron con la enzima DpnI (elimina el DNA parental o molde por ser el único metilado). El producto de la digestión se transformó en bacterias ultra-competentes XL-Gold (Stratagene). La incorporación de la mutación se comprobó por secuenciación en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIDI).

pBS-Gprk2<sub>NT</sub> C151A (Citosina 151 a Adenina) (X: secuencia diana de Gprk2 sentido/antisentido, X: nucleótido mutado):

- Gprk2 C151A sentido: 5'-<sup>132</sup>CCTGAAAGACAAATTAGATATAAGCTATGGCTACGTG<sup>168</sup>-3'.

- Gprk2 C151A antisentido: 5'-<sup>168</sup>CACGTAGCCATAGCTTATATCTAATTTGTCTTTCAGG<sup>132</sup>-3'.

pUAS-Gprk2<sub>K338R</sub> (X: secuencia diana de Gprk2 sentido/antisentido, X: nucleótido mutado, X: triplete mutado que origina cambio de aminoácido):

-Gprk2 K338R sentido: 5'-<sup>994</sup>GGGAAAATGTACGCGTGCA<sup>1032</sup>GAAAGCTGGAGAAAAAGCGC<sup>1032</sup>-3'.

-Gprk2 K338R antisentido: 5'-<sup>1032</sup>GCGCTTTTTCTCCAGCTTICIGCACGCGTACATTTCCC<sup>994</sup>-3'.

Mutantes del bucle citoplasmático de PS1 de ratón (X: secuencia diana de PS1 sentido/antisentido, X: nucleótidos mutados, X: triplete mutado que origina cambio de aminoácido):

- PS1<sub>loop</sub> T324A sentido (A→G): 5'-<sup>1447</sup>GAGCGGAGAGAGAGGCACAGGACAGTGGTTC<sup>1477</sup>-3'.

- PS1<sub>loop</sub> T324A antisentido: 5'-<sup>1477</sup>GAACCACTGTCCTGTGCTCTCTCTCCGCTC<sup>1447</sup>-3'.

- PS1<sub>loop</sub> S327A sentido (AG→GC): 5'-<sup>1457</sup>GAGACACAGGACC<sup>1488</sup>IGGTTCTGGGAACGATG<sup>1488</sup>-3'.

- PS1<sub>loop</sub> S327A antisentido: 5'-<sup>1488</sup>CATCGTCCCAGAACCAGCGTCCTGTGTCTC<sup>1457</sup>-3'.

- PS1<sub>loop</sub> S337A sentido (AG→GC): 5'-<sup>1485</sup>GATGATGGTGGCTTC<sup>1517</sup>IGAGGAGTGGGAGGCC<sup>1517</sup>-3'.

- PS1<sub>loop</sub> S337A antisentido: 5'-<sup>1517</sup>GGCCTCCCACTCCTCAGCGAAGCCACCATCATC<sup>1485</sup>-3'.

- PS1<sub>loop</sub> S365,367A sentido (A→G, AG→GC): 5'-<sup>1569</sup>GCTGTCCAGGAACTTGCTGGGGCCATTCTAACGA  
GTGAAGAC<sup>1610</sup>-3'.

- PS1<sub>loop</sub> S365,367A antisentido: 5'-<sup>1610</sup>GTCTTCACTCGTTAGAATGCCCCAGCAAGTCCTGGAC  
AGC<sup>1569</sup>-3'.

- PS1<sub>loop</sub> T324A, S327A sentido (A→G, AG→GC): 5'-<sup>1447</sup>GAGCGGAGAGAGAGGCACAGGACGCTTGG  
TTC<sup>1477</sup>-3'.

- PS1<sub>loop</sub> T324A, S327A antisentido (A→G, AG→GC): 5'-<sup>1477</sup>GAACCAGCGTCCTGTGCCTCTCTCTCC  
GCTC<sup>1447</sup>-3'.

## 2.6.- Extracción de RNA.

El RNA se obtuvo a partir de 30 discos de ala, 10-20 embriones de *Drosophila* (tanto salvajes como Gal4-638/UAS-Gprk2i) o células S2 crecidas en confluencia. Los homogenados se realizaron utilizando TRIZOL reagent RNA (Life Technologies) en la proporciones indicadas en la casa comercial. El RNA se extrae con cloroformo y se centrifuga 20 min a 4°C a 13.000 rpm para separar las fases. Tras eliminar la fase orgánica, se precipita con isopropanol durante al menos 30 min. a -20°C. Tras centrifugar a 4°C durante 20 min. a 13.000 rpm, el sedimento obtenido se lava con EtOH al 70%, se seca al aire y se resuspende en H<sub>2</sub>O (DEPC). El RNA se trata con DNasa durante 15-30 min a 37°C, siendo purificado por extracción con fenol:cloroformo y precipitado durante al menos 1 h. a -20°C con 3 volúmenes de una disolución de NaAc 90mM en EtOH. Tras lavar el sedimento con EtOH al 70%, el RNA se seca al aire y se resuspende en H<sub>2</sub>O (DEPC). La concentración se determina por absorbancia a 260 nm en el Nanodrop (Nanodrop, ND-1000). Se utilizaron reactivos y material libres de RNasas.

## 2.7.- Reacción de retro-transcripción (RT).

La reacción de retro-transcripción o transcripción inversa, que permite la generación de DNA a partir de RNA, se llevó a cabo utilizando el Gene Amp RNA PCR kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). El RNA se obtuvo como se detalla en el apartado 2.6. El molde empleado fue de 0,7 µg de RNA, previamente desnaturalizado 2 min a 70°C. Como cebador se utilizó oligo (dT)<sub>12-18</sub> y como enzima la Transcriptasa reversa MuLV, de acuerdo con las recomendaciones de la casa comercial. El DNA obtenido se conserva a -20°C hasta su utilización.

## 2.8.- RT-PCR cuantitativa.

El análisis por PCR cuantitativa se realizó en un ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) utilizando la prueba TaqMan de Applied Hs99999901\_s1 para la subunidad 18S del rRNA y la prueba TaqMan UP nº 61 de la Universal Probe Library (Roche, Indianápolis, IN) para Gprk2 y 20 ng del cDNA correspondiente. La cuantificación de la reducción de mRNA se realizó con el método  $\Delta\Delta C_t$  en el Servicio Interdepartamental De Investigación (SIDI).

## 2.9.- Generación de RNA de doble cadena.

Basado en el protocolo descrito en *Kennerdell, 1998*. Resumidamente, se diseñaron los oligonucleótidos que flanqueasen, aproximadamente, la misma región de Gprk2 utilizada en la generación del pUAS-Gprk2i (apartado 2.11.2) pero que presentasen en sus extremos 5' la secuencia del promotor T7 de la RNA polimerasa (TAATACGACTCACTATAGGG). Con estos oligos se generó, mediante PCR, el DNA molde flanqueado por el promotor mínimo de T7. La amplificación del DNA molde (EST LD42147, de Gprk2) rinde un fragmento de unos 500 pb que se purifica con el kit QIAquick PCR Purification kit (Qiagen), eluyendo el DNA con H<sub>2</sub>O (DEPC).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Este DNA molde se sometió a la reacción de transcripción “in vitro” con el kit MEGAscript (Ambion Company) empleando 200 ng del DNA obtenido y siguiendo las recomendaciones de la casa comercial, durante 4 horas a 37°C. A continuación, se llevó a cabo la purificación de los transcritos mediante extracción con fenol:cloroformo y precipitación con isopropanol. La concentración final obtenida se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm en un Nanodrop ND-1000 y mediante visualización en geles de agarosa.

-T7 Gprk2 sentido: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG<sup>1580</sup>AGGACCCCGAAAAGTATTCAAGCAAG<sup>1606</sup>-3'.

-T7 Gprk2 antisentido: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG<sup>2230</sup>GGGCTGAGTGCAGCCGGC<sup>2249</sup>-3'.

(X: promotor T7, X: secuencia Gprk2 sentido/antisentido).

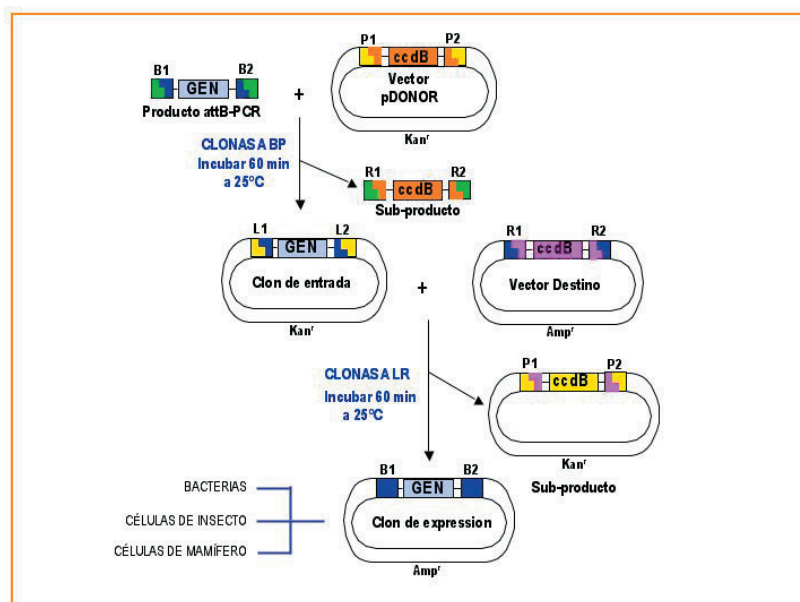
### 2.10.- Generación de sondas para la hibridación “in situ”.

Esta técnica se basa en la detección del mRNA directamente en el tejido en el que se expresa (Tautz, 1989). Para ello se sintetizaron “sondas” de RNA específicas que hibridasen con el mRNA del gen de interés (sondas Gprk2 sentido como control negativo, Gprk2 antisentido y Dpp antisentido), utilizando como molde el cDNA del gen de interés y el DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (ROCHE), según las indicaciones de la casa comercial.

### 2.11.- Clonajes realizados.

#### 2.11.1.- Adenovirus shRNA de GRK2.

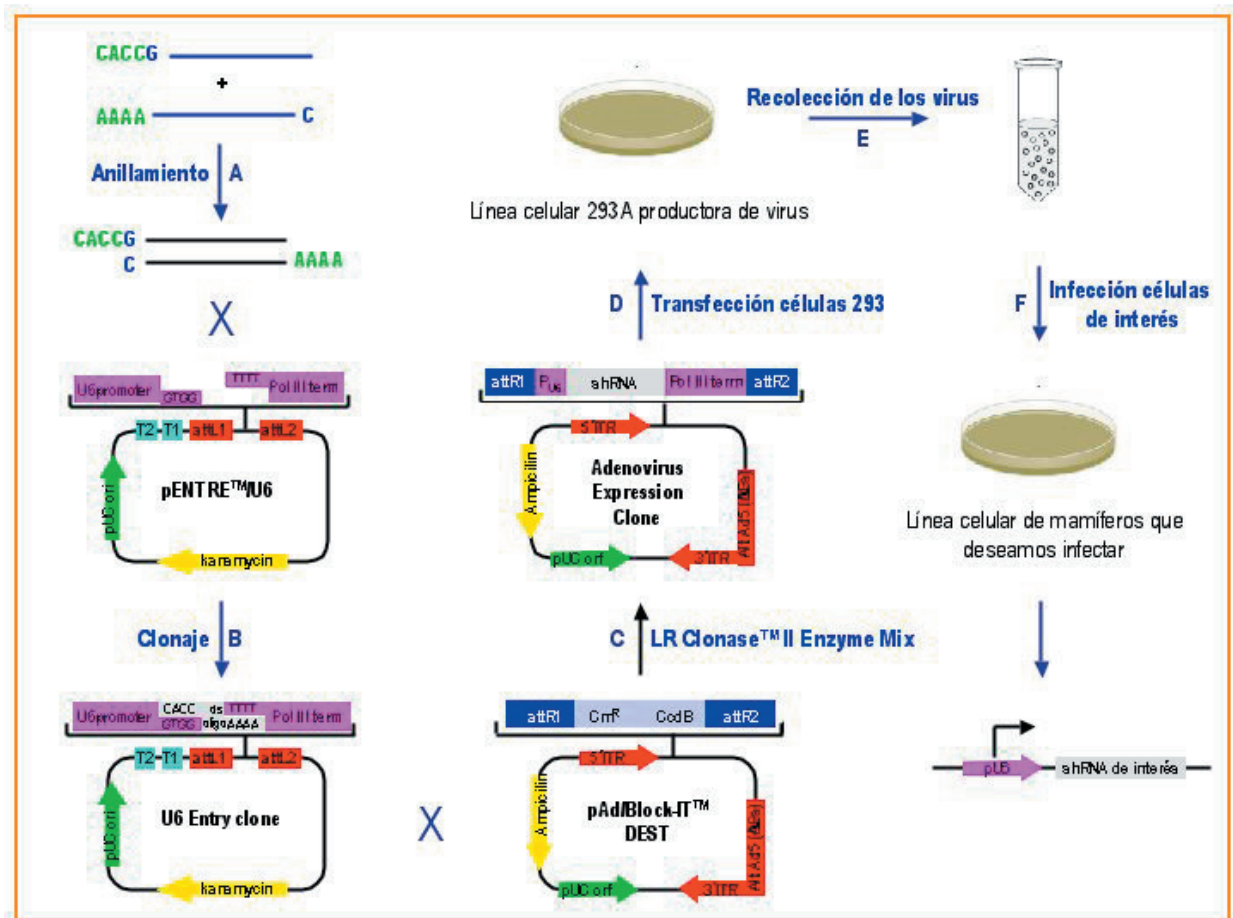
Para el proceso de generación del shRNA de GRK2 de humanos se siguió el protocolo del sistema GATEWAY (Invitrogen). Este método, basado en recombinasas, permite el clonaje del DNA de interés en un gran número de plásmidos para huéspedes, tanto eucariotas como procariotas, con epítomos variados (figura MyM 1).



**FIGURA MyM 1.- SISTEMA GATEWAY DE MULTICLONAJE.**

Esquema de generación del plásmido por el sistema Gateway ([www.invitrogen.com/gateway](http://www.invitrogen.com/gateway)). Este sistema se basa en la recombinación del bacteriofago “lambda” en el genoma de bacterias mediante las repeticiones att. En la bacteria, la secuencia se denomina attB (B de bacteria) y, en el fago, la secuencia se denomina attP (de fago). Cuando el fago infecta la bacteria, el DNA puede integrarse en el genoma bacteriano por recombinación de los sitios att en presencia de enzimas específicas (en el sistema Gateway, clonasa BP). Una vez integrado, los sitios se denominan attL y attR en el sistema Gateway, ya que los att han sido modificados para dirigir la recombinación, L “Left”, R “Right”. El fago se escinde del genoma por otro conjunto de enzimas (clonasa LR). La base del sistema Gateway es colocar los sitios att flanqueando el DNA a clonar y utilizar las enzimas LR y BP clonasa para realizar la inserción o escisión del DNA del fago en el genoma bacteriano. En el sistema Gateway, los sitios de recombinación son asimétricos (attL y attR) para dirigir la dirección del clonaje. La figura muestra como el DNA resultante de la PCR (donde se incluyen los sitios attB1 y attB2) se introduce en el “vector pDONOR” por recombinación con los sitios attP1 y attP2, por acción de la BP clonasa, liberándose el gen de selección ccdB (sólo pueden utilizarse bacterias girasa -/-) y generando el “Vector de Entrada”. A partir de un vector de entrada el DNA de interés puede integrarse en múltiples “vectores de destino” mediante una reacción de recombinación con la LR clonasa. Los vectores destino también tienen el gen selectivo ccdB entre sus sitios att.

## Diseño y generación del DNA viral.



**FIGURA MyM 2.- DIAGRAMA REPRESENTATIVO DE LA GENERACIÓN DE UN ADENOVIRUS.** Esquema resumen de la generación del adenovirus shRNA de GRK2 humano.

A) El primer paso del clonaje consiste en el anillamiento de los oligonucleótidos sentido y antisentido, de cadena sencilla, con sus extremos 5' y 3' complementarios al sitio de clonaje del vector.

B) Generación de un clon de entrada por ligación del DNA de doble cadena (DNAs), con extremos 5' protuberantes, en el vector pENTRE™U6.

C) Generación del vector de expresión (adenovirus) por recombinación mediante la acción de la enzima LR clonasa (ver **figura MyM 1**).

D y E) Transfección de las células empaquetadoras HEK-293A con el clon de expresión purificado, para la generación de las partículas virales.

F) Uso de las partículas virales generadas para infectar las células de mamífero en la que se desee reducir la expresión de la proteína determinada (en nuestro caso GRK2).

En primer lugar, se diseñaron los oligonucleótidos complementarios que permitiesen incorporar las secuencias attB1 y 2, blanco de las recombinasas, flanqueando la secuencia que constituiría el shRNA, mediante el programa informático de la casa Invitrogen, Invitrogen Block-iT RNAi Designer.

- GRK2 Top Strand (X: secuencia necesaria para el clonaje, X: bucle, X: secuencia diana de GRK2 sentido, X: secuencia diana de GRK2 antisentido):

5'-CACCG<sup>1701</sup>GCAAGAAAGCCAAGAACAAGC<sup>1722</sup>CGAA<sup>1722</sup>GCTTGTTCTTGGCTTTCTTGC<sup>1701</sup>-3'

## MATERIALES Y MÉTODOS

- GRK2 Bottom Strand (X: secuencia necesaria para el clonaje, XXX: secuencia del oligo Top Strand complementaria reversa):

5'-**AAAGCAAGAAAGCCAAGAACAAGC**TTCG**GCTTGTCTTGGCTTTCTTGC**-3'

Posteriormente se procedió al anillamiento de los dos oligos complementarios (**figura MyM 2A**), para la obtención de un oligonucleótido de doble cadena, según el protocolo establecido por la casa comercial. En resumen, 5 µl del oligo Top Strand (200 µM) y 5 µl del oligo Bottom Strand (200 µM) se incubaron con 2 µl de "10x oligo annealing buffer" y 8 µl de agua libre de DNasa / RNasa. La mezcla se calentó 4 minutos a 95 °C y, tras dejarla enfriar a temperatura ambiente, se centrifugó 5 segundos a máximas rpm, recuperando el DNA en el sobrenadante.

La reacción de ligación (**figura MyM 2B**) se llevó a cabo incubando 4 µl de "5x Ligation Buffer", 2 µl de pENTR™/U6, 1 µl del oligo de doble cadena (dc) (5nM), 12 µl de agua libre de DNasa / RNasa y la ligasa de DNA de T4 (1 U/µl), durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se procedió a la transformación de las bacterias competentes de Invitrogen One Shot™TOP10 de *E.coli* con 2 µl de la reacción de ligación. Los clones de entrada positivos se seleccionaron con Kanamicina (50 µg/ml) y se comprobó su eficacia para disminuir la expresión del gen diana mediante transfecciones transitorias de células humanas HEK-293. La cuantificación de los niveles de GRK2 se realizó mediante ensayos de inmunodetección tras electroforesis de los lisados celulares.

Después de seleccionar un clon de entrada, se realizó la reacción de recombinación LR (**figura MyM 2C**) entre la construcción de entrada pENTR™/U6 y el vector pAd/BLOCK-iT™-DEST, para crear el clon de expresión. En un eppendorf de 0,5 ml se mezclaron 50-150 ng del clon de entrada, 150 ng de pAd/BLOCK-iT™-DEST y TE pH 8 hasta un volumen final de 8 µl. Después se añadieron 2 µl de LR Clonase™ II enzyme mix y la mezcla se incubó a 25°C durante 1 hora. La reacción se detuvo incubando la mezcla con 1 µl de la solución de proteinasa K durante 10 minutos a 37°C. Por último, bacterias *E. coli* se transformaron con 2-3 µl de la reacción de recombinación LR y los clones de expresión positivos se seleccionaron con cloranfenicol (30 µg/ml).

5 µg del clon de expresión pAd/BLOCK-iT™-DEST purificado se digirieron con 2 µl de la enzima PacI, siguiendo el protocolo de la casa comercial. El DNA digerido se purificó utilizando el QIAGEN Gel Extraction Kit.

El mismo procedimiento se siguió para la generación del shRNA de GRK2 murino, llevado en paralelo por la Dra. Ivette Amerych en el laboratorio, diferenciándose únicamente en la secuencia de GRK2 a silenciar que se corresponde con la de ratón/rata.

### 2.11.2.- pUAS-Gprk2i.

Para silenciar la expresión de Gprk2 se seleccionó una región de 497 pb (comprendida entre los nucleótidos 1582-2079) del cDNA del gen Gprk2, que presenta menos de 20 nucleótidos homólogos con cualquier otro gen de *Drosophila* (Lee, 2003). La amplificación del fragmento Gprk2 C-terminal de 497 pb se hizo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando como molde el EST LD42147 de Gprk2, clonado en el vector pOT2 (Berkeley Drosophila Genome Project), utilizando los siguientes oligonucleótidos:

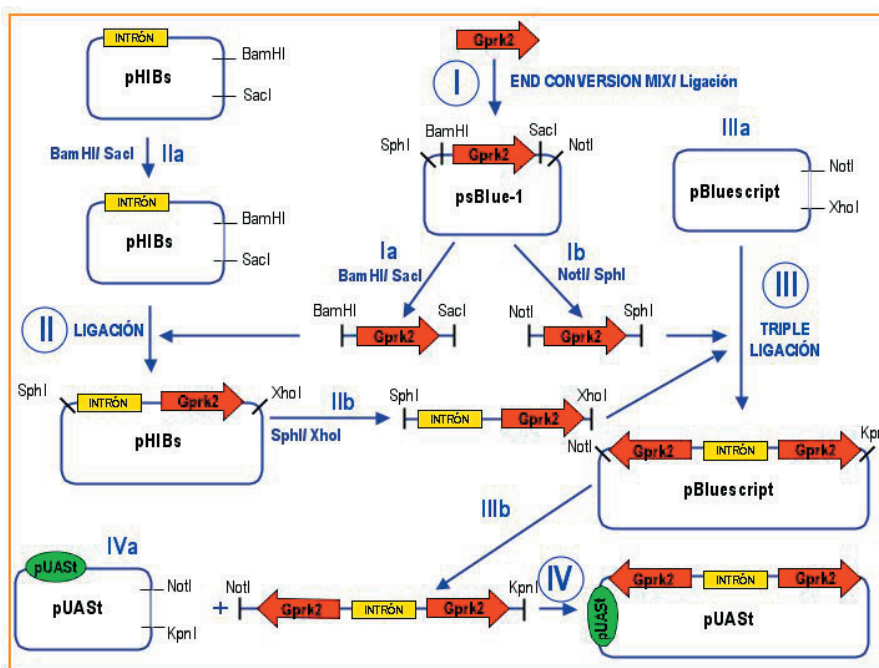
- Gprk2<sub>Ct</sub> sentido: 5'-<sup>1582</sup>**GACCCCGAAAAGTATTCAAGC**<sup>1602</sup>-3'

- Gprk2<sub>Ct</sub> antisentido: 5'-<sup>2079</sup>**GGGCTGAGTGCGAGCCGGC**<sup>2061</sup>-3'



El RNA interferente se generó mediante el clonaje de dos secuencias invertidas del cDNA de interés flanqueando el intrón 2 de *White* de *Drosophila* en el vector pUAS*t*, lo que permite el silenciamiento del gen en el tejido de interés (Lee, 2003).

La generación de la construcción RNA interferente de Gprk2 se resume en la **figura MyM 3**. El fragmento amplificado se clonó en el vector pSTBlue-1 (Vector Blunt, Novagen, Madison, WI) siguiendo el protocolo End Conversion Mix, Novagen, Madison, WI (**figura MyM 3I**). Posteriormente, el plásmido recombinante pSTBlue-1/Gprk2<sub>1582-2079</sub> se cortó, por un lado, con las enzimas BamHI/SacI y, por otro, con las enzimas SphI/NotI y se purificaron los fragmentos Gprk2 (BamHI/SacI) (**figura MyM 3Ia**) y Gprk2 (SphI/NotI) (**figura MyM 3Ib**).



**FIGURA MyM 3.- ESQUEMA DE LA GENERACIÓN DEL PLÁSMIDO pUAS-Gprk2i PARA DROSOPHILA.**

Resumen explicativo de los pasos a seguir para la obtención de la construcción pUAS-Gprk2i.

I) Ligación del fragmento de ~ 500 pb del cDNA del gen Gprk2 (rojo), obtenido mediante PCR, en el vector psBlue-1 (End Conversion Mix/ Ligación). Tras el clonaje el plásmido recombinante generado se corta, por un lado, con las enzimas BamHI y SacI (Ia) y, por otro, con las enzimas NotI y SphI (Ib).

II) Ligación del fragmento Gprk2, digerido con BamHI y SacI (Ia), en el vector pHIBs, que contiene el intrón 2 del gen *white*, previamente digerido con BamHI/SacI (IIa). Posterior-

mente el plásmido recombinante generado se digiere con las enzimas SphI/XhoI (IIb).

III) Triple ligación del fragmento Gprk2 (NotI/SphI (Ib)), junto con el inserto intrón-Gprk2 (SphI/XhoI (IIb)), en el vector pBluescript digerido con las enzimas NotI/XhoI (IIIa). El corte con las enzimas NotI/KpnI del plásmido recombinante generado da lugar al fragmento que presenta a Gprk2 en posiciones invertidas flanqueando al intrón *White* (IIIb).

IV) Ligación del fragmento Gprk2-intrón-Gprk2 (IIIb) en el vector pUAS*t* (NotI/KpnI (IVa)) para la generación del vector pUAS recombinante.

El fragmento Gprk2 (BamHI/SacI) (**figura MyM 3Ia**) se clonó posteriormente en el plásmido pHIBS-intrón 2 de *White* (**figura MyM 3II**), previamente digerido con BamHI/SacI (**figura MyM 3IIa**). El plásmido recombinante generado pHIBS-intrón-Gprk2 se digirió, a continuación, con SphI y XhoI (**figura MyM 3IIb**).

Posteriormente, se llevó a cabo la ligación triple (**figura MyM 3III**) de los fragmentos Gprk2 (NotI/SphI) (**figura MyM 3Ib**) y intrón-Gprk2 (SphI/XhoI) (**figura MyM 3IIb**) en el vector de pBluescript II SK+, digerido previamente con NotI y XhoI (**figura MyM 3IIa**). El inserto Gprk2-intrón-Gprk2 se obtuvo mediante la digestión del plásmido recombinante, producto de la ligación triple, con las enzimas NotI y KpnI (**figura MyM 3IIb**) y se utilizó para el clonaje en el vector de expresión pUAS*t* (**figura MyM 3IV**), previamente digerido con NotI y KpnI (**figura MyM 3IVa**).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.11.3.- pGEX-2T-Gprk2<sub>Nt</sub>

Para generar la proteína de fusión de Gprk2 a GST se procedió al clonaje del dominio de Gprk2 en el plásmido de fusión a GST pGEX-2T. El dominio seleccionado, para la producción de la proteína de fusión y posterior generación del anticuerpo, comprende la región próxima al extremo N-terminal de la quinasa (aminoácidos 153-260), seleccionada por presentar menor homología con la quinasa Gprk1, también de *Drosophila*.

La amplificación del fragmento por PCR se hizo utilizando como molde el EST LD42147 y utilizando los siguientes oligos, a los que se añaden las dianas BamHI y EcoRI en sus extremos 5' y 3', respectivamente, así como un codón de terminación en el oligo antisentido:

- GST-Gprk2<sub>Nt</sub> sentido: 5'-CGCG<sup>BamHI</sup>GGATCC<sup>457</sup>CACTGCAACAATACCACC-3'

- GST-Gprk2<sub>Nt</sub> antisentido: 5'-CGCG<sup>EcoRI</sup>GAATT<sup>STOP</sup>CTA<sup>780</sup>GCCGCTGTTGAGTTTGTTAC-3'

(X: secuencia diana de la enzima de restricción indicada, X: secuencia diana de Gprk2 sentido/antisentido, X: codón de parada).

El DNA amplificado se clonó en fase en el vector pGEX-2T(Pharmacia) en los sitios BamHI y EcoRI. Tras confirmar el clonaje, los fragmentos se secuenciaron en el SIDI, comprobándose que no se había introducido ninguna mutación durante el proceso de amplificación.

### 2.11.4.- pBS-EST LD42147 de Gprk2.

El fragmento EST (Gprk2) se clonó en el vector pBluescript II KS tras la digestión con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI. Las colonias positivas se seleccionaron por PCR de colonias y se comprobaron por secuenciación.

### 2.11.5.- pUAS-Gprk2.

Para la generación del plásmido pUAS-Gprk2 era necesario, en primer lugar, la generación del cDNA completo de Gprk2, pues sólo se disponía de distintos EST, siendo el EST LD42147 de Gprk2 (que comprende los nucleótidos del 332 al 2437) el que más zona abarca de la secuencia.

### RT-PCR

El RNA se obtuvo a partir de 20 embriones de moscas silvestres mediante el método del reactivo de TRIZOL Reagent (Invitrogen), como se detalla en el apartado 2.6, de acuerdo con el protocolo recomendado por la casa comercial. La obtención del cDNA a partir del RNA se llevó a cabo mediante una reacción de retrotranscripción utilizando oligo (dT)<sub>12-18</sub> y 0,7 µg del RNA (ver apartado 2.7). Para la PCR se utilizaron los oligos siguientes:

- Gprk2<sub>Nt</sub> sentido: 5'-CGC<sup>EcoRI</sup>GGAATTC<sup>inicio</sup>ATGGAATTAGAGAATATTGTGGCC-3'.

- Gprk2<sub>Nt</sub> antisentido: 5'-GGGATTGCTGCTGTTGAGCAGCA-3'.

(X: secuencia diana de la enzima de restricción indicada, X: secuencia diana de Gprk2 sentido/antisentido, X: codón de inicio).

Clonaje del cDNA completo de Gprk2 a partir del DNA genómico.

En una segunda aproximación, para clonar el cDNA de Gprk2 procedimos a utilizar el DNA genómico de *Drosophila* y a amplificar de forma separada cada uno de los exones presentes en la región 5' del DNA genómico de Gprk2 (que abarca desde el nucleótido 1 al 331 de su cDNA comenzando en 1 el ATG) de forma que, mediante su unión en fase, dispusiéramos del cDNA completo.

Para la preparación de DNA genómico, 50 moscas adultas se lisaron en 500 µl de solución A (0.1M Tris-HCl pH 9.0, 0.1M EDTA, 1% SDS y 0.5-1% DEPC), utilizando un homogenizador vidrio-vidrio de 3 mm de diámetro, y se incubaron 20-30 min. a 70°C. Transcurrido este tiempo, se añadieron 14 µl de acetato de potasio 8M por cada 100 µl de homogenado y se incubaron en hielo durante 30 min. Los homogenados se centrifugaron a 4°C durante 15 min. a 14000 rpm y se recogió el sobrenadante. El DNA genómico se precipitó añadiendo 0,5 volúmenes de isopropanol a temperatura ambiente y centrifugando 5 min. a 14000 rpm. El precipitado se lavó suavemente con EtOH 70%, se centrifugó y se dejó secar. Por último, el DNA precipitado se resuspendió en 100 µl de TE.

La región 5' del DNA genómico de Gprk2 presenta 4 exones de distinto tamaño (<http://flybase.bio.indiana.edu/cgi-bin/getseq.html>). Estos exones se corresponden con los siguientes nucleótidos del cDNA completo de Gprk2 (figura MyM 4): exón 1 (E1) (nucleótidos del 1-52), exón 2 (E2) (53-148), exón 3 (E3) (149-269), exón 4 (E4) (270-331), a los que había que añadir al EST LD42147. De éstos, los exones 2,3 y 4 tienen un tamaño aproximado de 100 nucleótidos por lo que era posible su amplificación por PCR. Sin embargo, el E1, al ser muy pequeño, decidimos generarlo por hibridación de dos oligos de DNA complementarios.

El proceso de obtención de la región 5' codificante de Gprk2 se inició amplificando por PCR los exones 2 (figura MyM 4 B1), 3 (C1) y 4 (D1) a partir del DNA genómico de embriones de *Drosophila* salvajes, mediante el uso de los oligonucleótidos siguientes:

Para E2 de Gprk2 (nt. 53-148):

- E2 sentido: 5'-<sup>PstI</sup>CTGCA<sup>53</sup>GTGGTTCCGACAGCAACAAGGG<sup>75</sup>-3'
- E2 antisentido: 5'-GGCGG<sup>EcoRI</sup>GAATTC<sup>BglII</sup>A<sup>151</sup>GAT<sup>148</sup>CTAATTTGTCTTTCAGGTTG<sup>128</sup>-3'

Para E3 de Gprk2 (nt. 149-269):

- E3 sentido: 5'-CCGC<sup>BglII</sup>AG<sup>149</sup>AT<sup>151</sup>CTAAGCTATGGCTACGTG<sup>169</sup>-3'
- E3 antisentido: 5'-GGCGG<sup>EcoRI</sup>GAATTC<sup>MscI</sup>TGG<sup>265</sup>CCACCTCATCCAGGAAG<sup>251</sup>-3'

Para el E4 de Gprk2 (nt. 270-331):

- E4 sentido: 5'-<sup>266</sup>TCAA<sup>270</sup>ATACGAGATCGAGTACATCTCGAACC<sup>296</sup>-3'
- E4 antisentido: 5'-<sup>EcoRI</sup>GAAT<sup>548</sup>TCCAGCTTCTTGTGATTGATGTCGC<sup>524</sup>-3'

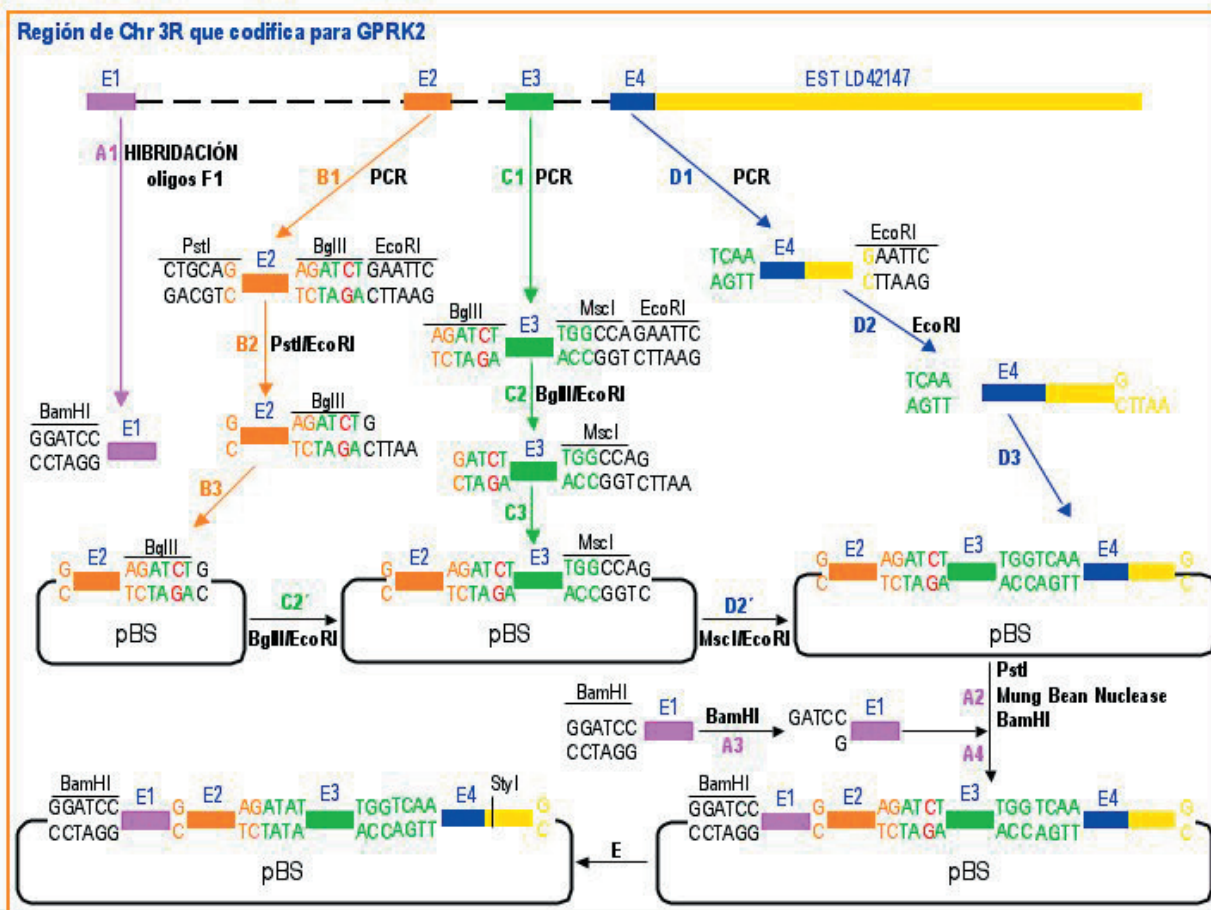
(X: secuencia diana de la enzima de restricción indicada, X: secuencia diana de Gprk2 sentido/antisentido).

Tras purificar los productos de la PCR con QIAquick PCR Purification kit (Qiagen), se realizó el clonaje de E2 en el vector pBluescript II KS (pBS) (figura MyM 4 B3), mediante la digestión previa de ambos DNAs con las enzimas de restricción PstI y EcoRI (figura MyM 4 B2). Los plásmidos recombinantes (pBS-E1) positivos se seleccionaron por digestión con la enzima de BglII y se comprobaron por secuenciación en el SIDI.

A continuación, se llevó a cabo el clonaje de E3 en el en sitio BglII y EcoRI (figura MyM 4 C2) del plásmido recombinante previamente generado, pBS-E2 (figura MyM 4 C3). Tras comprobar el clonaje por digestión con XbaI y HindIII de las preparaciones de DNA de las colonias seleccionadas, se confirmó por secuenciación en el SIDI.

## MATERIALES Y MÉTODOS

E4 amplificado por PCR, presentaba en su extremo 3' la diana para la enzima de restricción EcoRI pero carecía de diana en su extremo 5' por lo que, para llevar a cabo su clonaje en el vector pBS-E2-E3, E4 se digirió con EcoRI y el plásmido pBS-E2-E3 con EcoRI y MscI (que genera un extremo romo) (figura MyM 4 D2). Tras el clonaje, las colonias positivas se seleccionaron por digestión con XbaI/HindIII y se confirmaron por secuenciación.



**FIGURA MyM 4.- CLONAJE DE LA REGIÓN 5' CODIFICANTE DEL cDNA DE Gprk2.**

Esquema de la estrategia seguida para el clonaje de la región 5' de *Gprk2* en el vector pBluescript. En la figura se presenta el EST (amarillo) disponible en el laboratorio, que abarca desde los nucleótidos 332 al 2145, el exón 1 (E1, rosa), el exón 2 (E2, naranja), el exón 3 (E3, verde) y el exón 4 (E4, azul). Las distancias presentadas en el esquema no se corresponden en escala con el tamaño real del gen en el cromosoma Ch3R de *Drosophila* (<http://flybase.bio.indiana.edu/cgi-bin/getseq.html>).

A1) Los nucleótidos correspondientes al E1 se generan mediante la síntesis de los oligos complementarios incluyendo en sus extremos 5' la diana para BamHI, que será utilizada posteriormente para su clonaje en el vector (A2).

B1) Obtención por PCR del E2, añadiendo en su extremo 5' el sitio de corte para la enzima PstI y en 3' las dianas BglII y EcoRI. E2 se digiere con PstI (B2) y se clona en pBluescript SK (pBS), digerido con PstI/EcoRI (B2).

C1) Amplificación por PCR del E3, al que se añade en 5' la diana para la enzima BglII y en el extremo 3' los sitios de corte para las enzimas MscI y EcoRI. El producto de la PCR se digiere con las enzimas BglII y MscI (C2) y se clona en el plásmido recombinante pBS/E2, digerido con las enzimas BglII/EcoRI (C3), obteniéndose el plásmido recombinante pBS/E2-E3.

D1) Amplificación por PCR del E4, añadiendo en su extremo 3' la diana para el corte con la enzima EcoRI. El producto de PCR se digiere con la enzima EcoRI (D2) y se clona en el plásmido recombinante pBS/E2-E3, digerido con las enzimas MscI y EcoRI (D3), obteniéndose el plásmido recombinante pBS/E2-E3-E4.

A2) El DNA del E1 se digiere con la enzima BamHI y se clona en el extremo 5' de E2 del vector recombinante pBS/E2-E3-E4 (D3), digerido previamente con PstI, tratado con Mung Nuclease y, por último, con BamHI. El DNA recombinante generado porta los exones E1-4 codificantes de Gprk2 en fase de lectura para su posterior unión al vector pUAS-ESTLD42147 de Gprk2.

E1 se generó por hibridación (**figura MyM 4 A1**) de los oligos siguientes:

Gprk2<sub>Nt</sub> genómico E1 sense: 5'-CCGC<sup>BamHI</sup>GGATCC<sup>1</sup>ATGGAATTAGAGAATATTGTGGCCAAT  
ACGGTCTACTTGAAAGCGAGAGAAG<sup>52-3'</sup>

Gprk2<sub>Nt</sub> genómico E1 antisense: 5'-<sup>52</sup>CTTCTCTCGCTTCAAGTAGACCGTATTGGCCACAATA  
TTCTCTAATTCCAT<sup>1</sup>GGATCC<sup>BamHI</sup>GCGG-3'

(X: secuencia diana de la enzima de restricción indicada, X: secuencia diana de Gprk2 sentido/antisentido).

Los oligos se resuspendieron en tampón de anillamiento (10 mM Tris-HCl pH7,5-8; 50 mM NaCl, 1mM EDTA) a una concentración de 200 µM. El eppendorf con los oligos sentido y antisentido se calentó 4 minutos a 95°C y, a continuación, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Para realizar el clonaje de E1 en pBS-E2-E3-E4 (**figura MyM 4 A4**), el plásmido se digirió previamente con PstI, que genera extremos 3' protuberantes. Para conseguir extremos romos, el plásmido se trató con la enzima Mung Nucleasa y, posteriormente, se desfosforiló por acción de la enzima fosfatasa alcalina siguiendo protocolos convencionales (**figura MyM 4 A2**). A continuación, tanto el plásmido pBS-E2-E3-E4 (PstI/Mung) desfosforilado en 5', como E1, se digirieron con BamHI (**figura MyM 4 A3**) y se llevó a cabo la ligación. Las colonias positivas se seleccionaron por PCR de colonias y se comprobaron por secuenciación (SIDI).

Para poder llevar a cabo el clonaje E3 en fase fue preciso mutar el nucleótido 151 (A→C), para generar el sitio de corte de la enzima BglII (AGATCTG). Por tanto, una vez clonados los fragmentos que constituyen Gprk2<sub>Nt</sub>, se llevó a cabo una reacción de mutagénesis dirigida (ver apartado 2.5) para sustituir el nucleótido C<sup>151</sup> por A.

Tras comprobar por secuenciación que no existían errores en la secuencia generada, se procedió a clonar el DNA Gprk2<sub>Nt</sub> (E1-E2-E3-E4) en el plásmido pBS-EST LD42147. Los plásmidos pBS-Gprk2<sub>Nt</sub> y pBS-EST LD42147 se digirieron con BamHI y Styl para realizar la ligación de Gprk2<sub>Nt</sub> (Styl/BamHI) y pBS-EST (Styl/BamHI), obteniéndose así pBS-Gprk2 completo (E1-E2-E3-E4-EST).

Por último, Gprk2 se clonó en fase en pUAS<sub>t</sub>, tras la digestión con las enzimas NotI y KpnI, para permitir la expresión correcta de la proteína. Las colonias positivas se seleccionaron por digestión con NotI/ KpnI y se confirmaron por secuenciación.

### 3.- CULTIVOS CELULARES

#### 3.1.- Líneas celulares establecidas.

Se han utilizado diversas líneas celulares establecidas: células humanas embrionarias de riñón HEK-293 obtenidas de ATTC (American Type Culture collection), HEK-293A (contiene una copia establemente integrada de E1 que proporciona las proteínas E1 (E1a y E1b) en trans, necesarias para la generación del adenovirus de Invitrogen Corporation), neuroblastomas humanos SH-SY5Y (ATCC), neuroblastomas de ratón N2a (ATCC), células de tejido de ovario pupal de la mariposa *Spodoptera frugiperda* Sf9 (ATCC), células del huevo de la mariposa *Trichoplusia ni* High5 (Invitrogen Corporation), células Schneider de *Drosophila melanogaster* (S2) (ATCC).

Las líneas celulares HEK-293, HEK-293A, SH-SY5Y y N2a se crecieron en monocapa, sobre placas p60, p100 o frascos de 75 ml (Falcon), en Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con L-glutamina 2mM, suero fetal bovino (FBS) al 10% y una mezcla de antibióticos (50 µg/ml gentamicina, estreptomicina 0,01% y penicilina G 0,063%). Todos estos tipos celulares se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>.



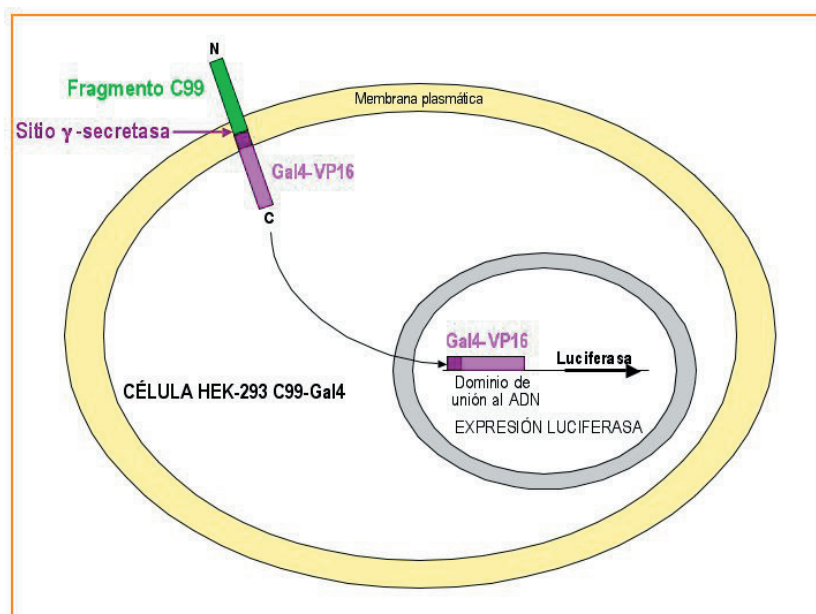
## MATERIALES Y MÉTODOS

Las líneas de insecto Sf9 y High5 se crecieron en monocapa en medio HyQSFX-Insect (Cultek) suplementado con FCS al 8% y gentamicina 50 µg/ml a 27°C en atmósfera seca sin CO<sub>2</sub>. Para las infecciones, donde se necesita un alto número de células, las células Sf9 se crecen en suspensión en medio HyQSFX-Insect (Cultek) suplementado con FBS al 8%, gentamicina 50 µg/ml y 0,1 % de ácido plurónico (Pluronic F-68, SIGMA) a 27°C con agitación (120 rpm).

La línea de *Drosophila* S2 se creció en medio Bio-Whittacker<sup>®</sup> Insect X-Press (Lonza), suplementado con una mezcla de antibióticos (50 µg/ml gentamicina, estreptomycin 0,01% y penicilina G 0,063%) en presencia de 8% FBS, a 27°C en atmósfera seca sin CO<sub>2</sub>.

### 3.2.- Líneas celulares estables.

Células HEK-293 C99-Gal4 (línea celular que sobre-expresa de forma estable el fragmento C99 del APP, fusionado en su extremo carboxilo-terminal al activador transcripcional quimérico de levaduras-virus Gal4-VP16) (Sadowski, 1988) fueron proporcionadas por la antigua empresa farmacéutica Aventis-Francia, antes de su fusión con Sanofi-Synthelabo (**figura MyM 5**), células de ovario de hamster CHO que expresan establemente APP-751 humano (CHO-7W) o APP-751 y PS1 humana (CHO-PS70) fueron cedidas por el Dr. Miguel Medina (Cavaliere Ottolengui Scientific Institute, Università degli Studi di Torino, Torino, Italia. En la actualidad en Noscira, Grupo Zeltia). Todos estos tipos celulares se crecieron con el mismo medio y en las mismas condiciones que las líneas celulares establecidas de mamífero descritas en el apartado anterior. Las células CHO-7W se mantienen añadiendo al medio el antibiótico G418 (150-200 µg/ml), las CHO-PS70 añadiendo G418 (150-200 µg/ml) y Puomicina (25 µg/ml) y las C99-Gal4 añadiendo G418 (300 µg/ml).



**FIGURA MyM 5.- CÉLULA HEK-293 C99-Gal4.**

Dibujo esquemático de una célula HEK-293 C99-Gal4. Estas células expresan de forma estable el fragmento C99 de la proteína precursora del péptido β-amiloide (APP) (Laudon, 2007), fusionado en su extremo carboxilo terminal con el activador transcripcional quimérico levadura-viral Gal4-VP16 (Gal 4, activador de levaduras, y VP16, porción altamente ácida de la proteína activadora de la transcripción VP16 del virus del herpes simple) (Sadowski, 1988), y el gen reportero de la luciferasa bajo el control del promotor de levaduras Gal4. La actividad γ-secretasa sobre el fragmento C99 permite la liberación del fragmento Gal4-VP16, que se unirá al promotor del gen luciferasa e inducirá eficientemente su transcripción.

Además, hemos generado otras líneas celulares estables:

*Línea celular S2 estable para myc-Smo.*

Para la generación de una línea estable que sobre-expresase myc-Smo se procedió al clonaje de myc-Smo (proporcionado por Jin Jiang, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Estados Unidos) en el vector de expresión inducible en células de insectos, que presenta resistencia a puromicina, pRmHa3(puromycin) (cedido amablemente por Stephen M. Cohen, European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany). El plásmido generado se utilizó para la transfección estable de células S2 (ver apartado 3.4.2). La línea estable S2-myc-Smo generada se creció en medio Bio-Whittaker<sup>R</sup> Insect X-Press (Lonza), suplementado con una mezcla de antibióticos (50 µg/ml gentamicina, estreptomycin 0,01% y penicilina G 0,063%) en presencia de 8% FBS. La selección de la línea se realizó mediante el tratamiento con puromicina (25 µg/ml). Para inducir la expresión de myc-Smo, las células se tratan con 0,7 mM de CuSO<sub>4</sub> durante 24-36 horas en medio X-Press suplementado con FBS al 8% sin puromicina (Denef, 2000).

*Línea celular estable para el dominio amino-terminal de Hedgehog (HhN).*

Células S2 estables para el dominio amino-terminal de Hh se transfectaron de forma estable con el plásmido pRmHa3(puromycin)-HhN (cedido por Stephen M. Cohen, European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany) (Denef, 2000) (ver apartado 3.4.2).

La línea estable S2-HhN se creció y se seleccionó como en el apartado anterior. El medio condicionado Hh se obtuvo por incubación con 0,7 mM de CuSO<sub>4</sub> durante 24-36 horas, en medio X-Press sin puromicina (Denef, 2000). Este medio se utiliza, directamente, como fuente de Hh.

### 3.3.- Plásmidos y construcciones utilizados.

#### 3.3.1.- Plásmidos utilizados.

- Vector pcDNA3.1 procede de la casa comercial Invitrogen.
- Vector pBlueScript KS (Stratagene).
- Vector pGEX-2T obtenido en la casa comercial Pharmacia.
- Vectores del sistema GATEWAY: pENTRE™/U6 y pAd/Block-IT™DEST de Invitrogen..
- Vectores pHIBs, psBlue-1, pUAS, pHelper y pUAS-Gal4-actina fueron proporcionados por el Dr. J. F. De Celis y la Dra. Mar Ruiz Gómez (Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Madrid, España).
- pRmHa3(puromycin) cedido por Stephen M. Cohen, European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany.
- Las construcciones pcDNA3-GRK2 y pcDNA3-GRK2-K220R bovinos fueron cedidas por el Dr. J. L. Benovic (Universidad Thomas Jefferson, Philadelphia, Estados Unidos).
- La construcción pcDNA3.1-PS1wt humana fue generada en nuestro laboratorio por la Dra. Esperanza Morato.
- El plásmido pcDNA3.1-SF β<sub>2</sub>AR HT del receptor β<sub>2</sub>-adrenérgico, unido al epítipo flag (SF) y a una cola de histidinas (HT, del inglés “histidine tagged”) para facilitar su inmunoprecipitación, fue generado por la Dra. Ana Ruiz Gómez (Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Madrid, España) en el laboratorio de Brian K. Kobilka (Howard Hughes Medical Center, Stanford University, CA).
- Las construcciones pcDNA3-myc-DREAM, pcDNA3-DREAMS95A, pcDNA3-DREAMS95D fueron cedidas por el Dr. José Ramón Naranjo (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, España).

## MATERIALES Y MÉTODOS

- EST LD42147 de Gprk2 clonado en el vector pOT2 (Berkeley Drosophila Genome Project).
- El plásmido pUAS-myc-Smo fue cedido por Jin Jiang (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Estados Unidos).
- pUAS-GFP-Smo fue proporcionado por Alan, J. Zhu (Department of Cell Biology, NC10. Lerner Research Institute, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, Ohio).
- Las construcciones pGEX-2T-PS1<sub>loop</sub> murina (aminoácidos 295-374) y pGEX-2T-PS1<sub>Ct</sub> murina (aminoácidos 454-467) fueron proporcionados por el Dr. F. Zafra (CBMSO, Madrid, España).
- Las construcciones pcDNA3-GRK2-S670D y pcDNA3-GRK2-S670A, fueron generadas en el laboratorio por la Dra. Ana Elorza
- Las construcciones pcDNA3-GRK2-Y13/86/92F (GRK2-Y3D), generada por la Dra. Susana Sarnago, y pcDNA3-GRK2-Y13/86D (GRK2-Y2D), por la doctora Catalina Ribas, se realizaron también en el laboratorio.

### 3.3.2.- Construcciones generadas.

- Construcción shRNA de GRK2 (de humanos) se generó como se detalla en el apartado 2.11.1 de MyM de esta memoria.
- UAS-Gprk2i generado como se detalla en el apartado 2.11.2.
- pGEX-2T-Gprk2<sub>Nt</sub> generado como se detalla en el apartado 2.11.3.
- pBS-EST LD42147 generado como se detalla en el apartado 2.11.4.
- pUAS-Gprk2, generado como se detalla en el apartado 2.11.5.

## 3.4.- Transfecciones.

### 3.4.1.- Transfecciones transitorias.

Las transfecciones transitorias de las células HEK-293, HEK-293A, SH-SY5Y, N2a se llevaron a cabo en placas P100, P60 o multipocillo P6, a una confluencia de entre el 70 y el 80 % con Lipofectamina Plus™ Reagent (Invitrogen), si no se indica otro método en el texto, siguiendo el protocolo de la casa comercial. Resumidamente, las células se incuban a 37°C en medio OPTIMEM (con 5-10 µg de DNA por P100 o 1-2 µg por P6) con 8 µl de Lipofectamina por cada µg de DNA. Tras 4 horas de incubación a 37°C, en el medio de transfección se añade un volumen de medio DMEM suplementado con suero al 20% para obtener una concentración final de suero del 10%. Al día siguiente, se reemplaza el medio por DMEM 10% suero y se deja que las células se recuperen al menos durante 24 horas, antes de procesar el cultivo para el experimento.

Para la transfección de células S2 se utiliza Cellfectin® Reagent (Invitrogen). 15 millones de células S2 se siembran en una placa p100 con medio X-press 8 % FCS. Al día siguiente, las células se incuban a 27°C en 3,75 ml de medio X-Press sin suero con 30 µg de DNA y 8 µl de Cellfectin por cada µg de DNA utilizado. Tras 3-5 horas de incubación a 27°C, el medio de transfección se reemplaza por medio X-Press 8% suero con antibióticos.

En cada experimento y para todos los tipos celulares se añade la cantidad de vector vacío necesaria para mantener constante la cantidad total de DNA por placa. La expresión transitoria de las distintas proteínas se confirmó por análisis de los lisados totales mediante inmunodetección tras electroforesis ("inmunoblot") con anticuerpos específicos, como se explica en el apartado 15.1.



### 3.4.2.- Transfecciones estables.

Para la generación de las células S2 estables, las transfecciones se realizaron utilizando FuGENE6 Transfection Reagent (Roche). 5 millones de células S2 se siembran en una placa p60 con medio X-Press 8% suero. 24 horas después, las células se incuban a 27°C en medio X-Press con 43,75 µl de reactivo FuGENE6 y 15,6 µg de DNA. Tras 3-5 horas de incubación a 27°C, el medio de transfección se reemplaza por medio X-Press 8% suero (más antibióticos). 24 horas después de la transfección, las células se siembran en distintas diluciones en placas p100 y a las 24 horas se comienza la selección de las células transfectadas añadiendo al medio de cultivo puromicina (25 µg/ml).

### 3.5.- Generación del adenovirus “stock”.

Para generar los adenovirus stock se sembraron  $8 \times 10^5$  células HEK-293A por pocillo de placa de 6 pocillos (p6) y se transfectaron con 1 µg del plásmido de expresión pAd/BLOCK-iT™-DEST, digerido con PacI, utilizando el método de transfección DNA de la Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) (**figura MyM 2D**), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. 48 horas después de la transfección, las células se transfirieron a una placa p100. El medio se cambió por medio fresco, cada 2 o 3 días, hasta que aparecieron regiones de efecto citopático visibles (8-10 días post-transfección). Entonces, las células y el medio se transfirieron a un falcon 15 ml y se procedió a preparar el lisado viral crudo. Para ello, las células se sometieron a tres ciclos de congelación/descongelación (30 min. a -80°C/ 15 min. a 37°C) (**figura MyM 2E**), siguiendo protocolos convencionales.

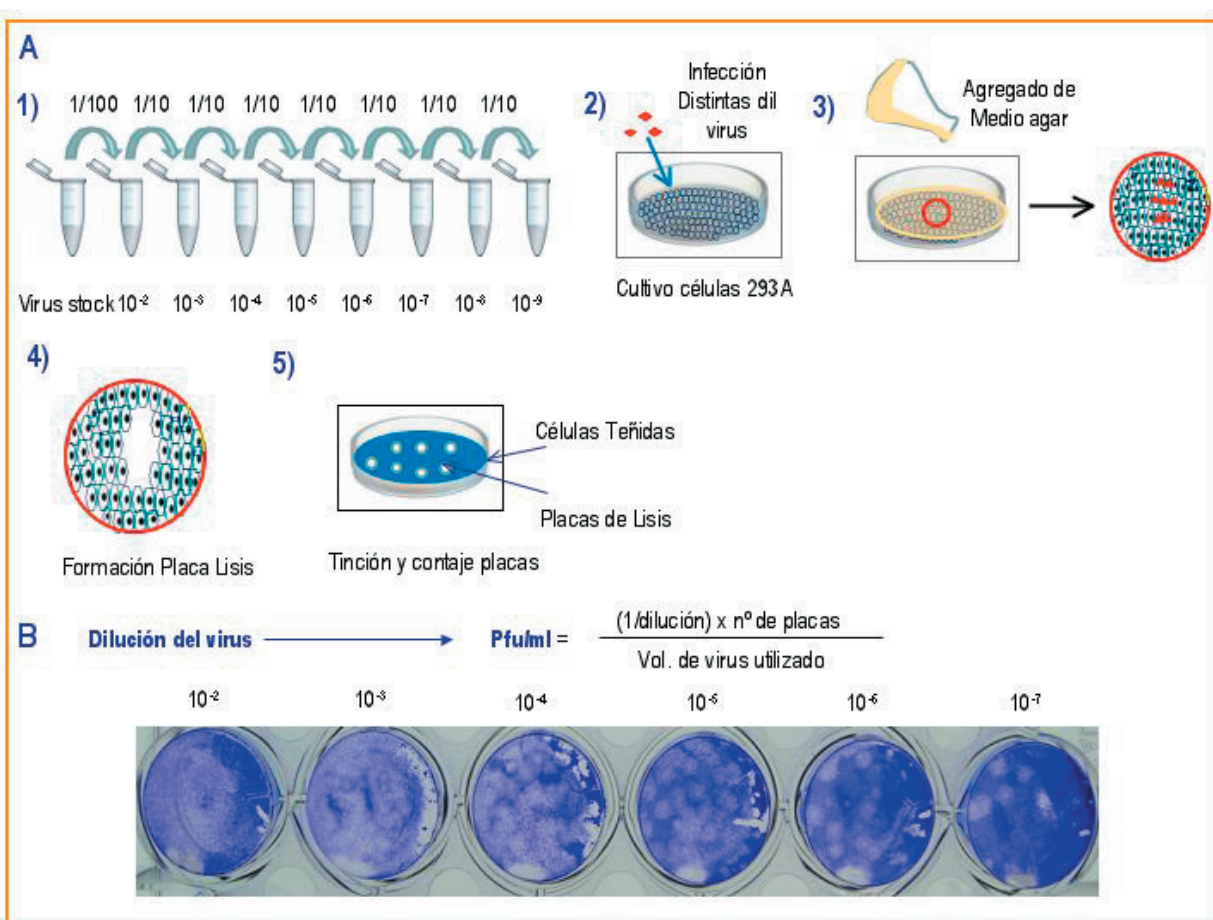
### 3.6.- Infección de células con adenovirus.

La disminución de la expresión de GRK2 endógeno en las células SH-SY5Y, HEK-C99 y N2a se llevó a cabo mediante la infección con el adenovirus shRNA-GRK2 humano (MOI 10) y de ratón (MOI 25), respectivamente, en medio OPTIMEN con suero al 2%. Como control negativo de la infección se utilizó el adenovirus control shRNA-lamina. A las 12 horas, el medio de infección se reemplaza por DMEM 10% suero y, a las 48 horas, las células se procesan para realizar el experimento.

### 3.7.- Titulación viral.

La titulación del adenovirus se realizó siguiendo las indicaciones de la casa comercial. En resumen, se siembran células 293A de tal manera que alcancen un 80-90 % de confluencia en el momento de la infección. 24 horas después, se hacen diluciones seriadas del virus ( $10^{-4}$  a  $10^{-9}$ ) en medio DMEM 2% suero en un volumen final de 1 ml que se añaden sobre las células sin medio, incubándose durante la noche (ver esquema resumen en la **figura MyM 6**).

A la mañana siguiente, se elimina el virus y las células se cubren con 2 ml/ pocillo de una solución de agarosa (DMEM complementado con el 2% FBS y agarosa 0.4 %). 2 ó 3 días después, las células se cubren con 1 ml adicional de solución de agarosa y se vigilan hasta la aparición de placas de lisis. Una vez las placas de lisis aparecen, se procede a su fijación y tinción incubando con la solución de tinción (Formaldehído 5% + cristal violeta 1%) durante, al menos, 12 horas para, a continuación, contarlas visualmente y determinar el título viral (ver apartado 16.10.12 en Current Protocols in Molecular Biology).



**FIGURA MyM 6.- TITULACIÓN DEL ADENOVIRUS GENERADO.**

A) Esquema ilustrativo de la titulación de un stock viral.

(1) Preparación de diluciones seriadas del virus a titular en medio de cultivo con bajo suero (DMEM 2% FCS, en nuestros ensayos). (2) Infección con 1 ml de las diluciones virales generadas por pocillo de placa de 6 pocillos (p6) con células HEK-293A. (3) Adición de medio-agarosa. (4) Sección ampliada de las células infectadas que formarán la placa de lisis. (5) Las células infectadas son lisadas por el virus, infectando a las células circundantes hasta la generación de placas de lisis. (6) Fijación y tinción de las células, detectándose las placas de lisis por la falta de tinción.

B) Fotografía representativa del resultado de la titulación del adenovirus shRNA de GRK2. Mediante el conteo de las placas de lisis y conociendo □

### 3.8.- Tratamientos celulares.

Los tratamientos, estimulaciones o inhibiciones de las células transfectadas transitoriamente se llevaron a cabo a las 36-48 h después de la transfección, recogiendo las células con tampón fosfato salino (PBS) frío, en ocasiones suplementado con ortovanadato sódico 1 mM, para su posterior lisis en el tampón adecuado.

#### 3.8.1. Estimulación con isoproterenol.

La estimulación con isoproterenol (SIGMA) de células N2a y HEK-293, a una concentración final de 10  $\mu$ M, se llevó a cabo a 37°C en medio de cultivo suplementado con HEPES 20mM (pH 7.5) y 1mM de ácido ascórbico (SIGMA). En los experimentos en los que se inhibe la internalización del receptor las células se pre-incubaron con sacarosa (750mM) o a 4°C, como se detalla en los pies de figura y en el texto.

### 3.8.2. Tratamiento con el inhibidor de $\gamma$ -secretasa X (L-685,458).

El inhibidor de  $\gamma$ -secretasa X (L-685,458) de Calbiochem se añadió a una concentración final de 10  $\mu$ M a las células HEK-293 C99-Gal4, y se dejó actuar durante 24 horas antes de la medida de la actividad secretasa,

### 3.8.3. Tratamiento con el inhibidor del proteasoma MG132.

El inhibidor del proteasoma MG132 (30  $\mu$ M) (Biomol) se añadió al medio libre de metionina durante 90 minutos y, posteriormente, se mantuvo durante el ensayo de “pulso” y la “caza”.

### 3.8.4.- Tratamiento con el RNA de doble cadena.

1,5  $\mu$ g de dsRNA de Gprk2 (generado según se detalla en apartado 2.9) se añaden sobre  $1 \times 10^6$  células S2, sembradas en pocillo de una placa multipocillo p6 con 1 ml de medio Bio-Whittacker<sup>®</sup> Insect X-Press (Lonza), suplementado con una mezcla de antibióticos (50  $\mu$ g/ml gentamicina, estreptomicina 0,01% y penicilina G 0,063%), en ausencia de suero. El tratamiento se mantiene durante 4 días a 27°C (Saleh, 2006).

## 4.- OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CEREBRALES DE RATÓN.

Los cerebros se obtuvieron de ratones C57BL/6 salvajes y heterocigotos para el gen de GRK2. A continuación, se diseccionaron para la extracción de las regiones hipocampo y corteza, agrupándose el cerebro restante en lo que procedimos a llamar “resto”. Las distintas regiones cerebrales se lisaron en Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM e inhibidores de proteasas y se homogenizaron con un Politron PT3000 KINEMATIC® (2 ciclos de 20 segundos cada uno). Por último, los homogenizados se centrifugaron durante 5 min. a 800xg para recoger los sobrenadantes.

## 5. ENSAYO DE ACTIVIDAD $\gamma$ -SECRETASA: GENERACIÓN DEL FRAGMENTO DOMINIO INTRACITOPLÁSMICO DE APP (AICD).

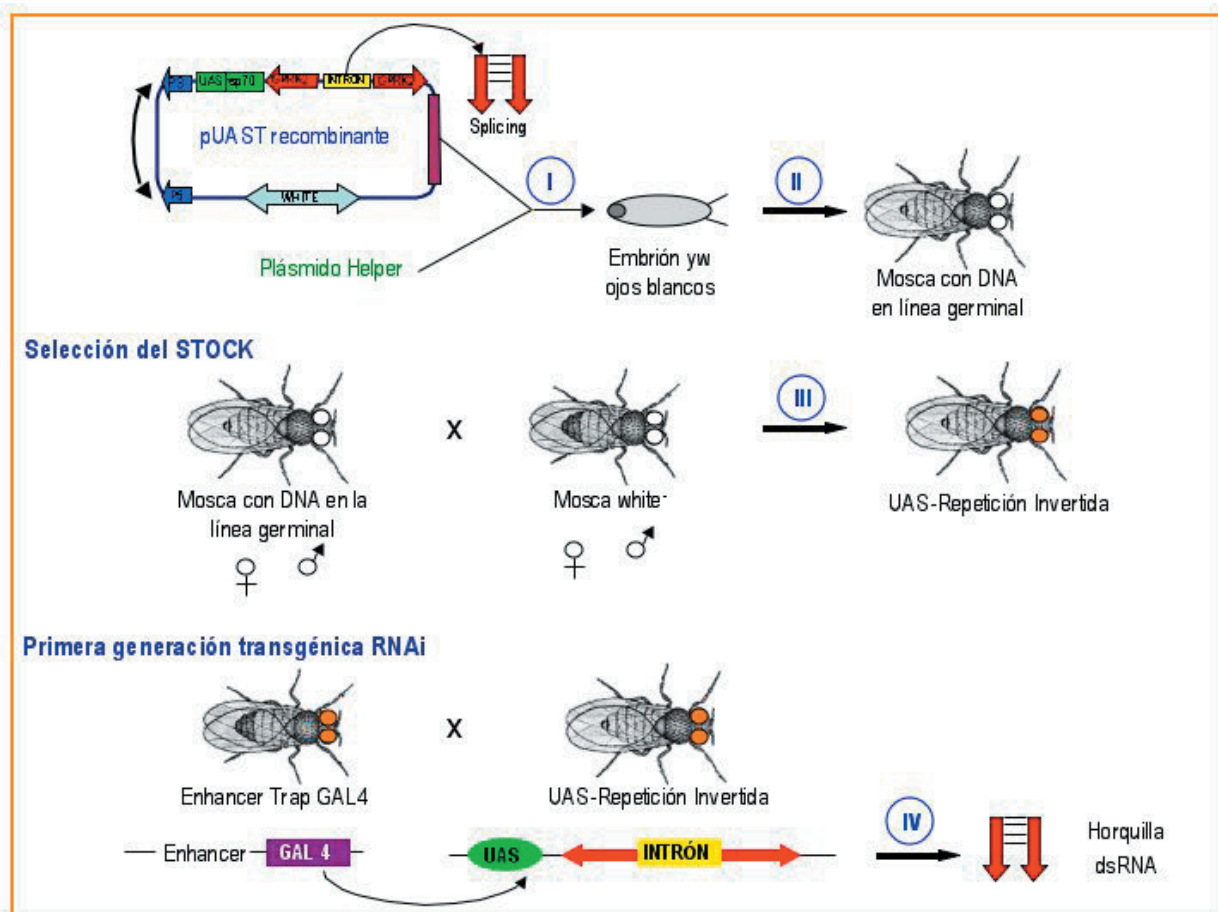
Los lisados de cerebro, obtenidos según el apartado anterior, se centrifugaron a 16000xg/40 min. Las fracciones de membrana obtenidas se resuspendieron en tampón de actividad (citrato sódico 50 mM pH 6.5) (25  $\mu$ l/p100). La cantidad de proteína total se midió en cada fracción y la misma cantidad de proteínas (procedente de ratones salvajes o heterocigotos para la deficiencia de GRK2) se incubó en tampón de actividad con  $MgCl_2$  (16mM), NaF (4,5 mM), ATP (150  $\mu$ M) y  $AlF_4^-$  (150 mM NaF, 500  $\mu$ M  $AlCl_3$ ), durante 2 horas a 37°C, para generar AICD por corte de la  $\gamma$ -secretasa sobre el APP. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron a 70000 rpm/ 1h. El sobrenadante se sometió a electroforesis en gel de bicina (apartado 11.1.3) y se analizó por inmunomarcado tras electroforesis usando el anticuerpo anti-APP<sub>ct</sub> (ver apartado 15.4).

## 6.- GENERACIÓN DE LA LÍNEA GERMINAL TRANSGÉNICA UAS-Gprk2i.

El pUAS-Gprk2i se utilizó para la transformación de la línea germinal siguiendo los procedimientos establecidos (figura MyM 7, Lee, 2003). En resumen, el vector pUAS recombinante se inyectó, junto con el plásmido Helper, en la parte posterior de embriones yw de *Drosophila* en las primeras fases del desarrollo (figura MyM 7I), para generar moscas con el DNA incorporado en la línea germinal (figura MyM 7II). Utilizando procedimientos estándar de genética de *Drosophila*, seleccionamos diferentes líneas transgénicas con inserciones de la construcción pUAS-Gprk2i (figura MyM 7III). Mediante combinaciones genéticas, y utilizando el sistema

## MATERIALES Y MÉTODOS

Gal4/UAS (Brand, 1993), dirigimos la expresión del RNAi en el disco imaginal de ala en individuos 638-Gal4 / PUAS-Gprk2i (figura MyM 7IV). Todo este trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Jose Félix de Celis del CBMSO, bajo la supervisión y con la ayuda de la Dra. Cristina Molnar.



**FIGURA MyM 7.- DIAGRAMA EXPLICATIVO DE LA GENERACIÓN DE MOSCAS TRANSFORMANTES.**

Se presenta una modificación de las figuras y esquemas incluidos en Lee, 2003.

I) Inyección del vector pUAS recombinante (obtenido como se detalla en el apartado 2.11.2 de MyM), junto con el plásmido helper, en la parte posterior de embriones yw en las primeras fases del desarrollo.

II) Obtención de individuos con el DNA incorporado en la línea germinal.

III) Selección del stock de *Drosophila melanogaster* que ha incorporado el DNA, mediante el cruce con moscas yw y detección de marcadores fenotípicos (color de los ojos).

IV) Selección del sistema Gal4/UAS adecuado para silenciar el gen de interés en un tejido y/o estadio del desarrollo de *Drosophila*. El cruce de las líneas UAS con las líneas Gal4, dará lugar a heterocigotos F1 con ambos genes. La expresión específica de tejido de las repeticiones invertidas, dirigida por Gal4, dará lugar a un RNAs competente para inducir el RNAi en *Drosophila*.

## 7.- LÍNEAS DE DROSOPHILA.

Hemos usado los alelos de *Gprk2* *Gprk2*<sup>EY09213</sup>, *Gprk2*<sup>06936</sup> y *Gprk2*<sup>PL00297</sup>; la mutación nula de *Smo*<sup>2</sup>; las líneas *Gal4* *Gal4*-638, *Gal4*-ptc, *Gal4*-hh, *Gal4*-Ci y *Gal4*-sal y las líneas UAS *UAS*-hh, *UAS*-ptc, *UAS*-Smo<sup>SD123</sup>, *UAS*-FLP, *UAS*-GFP, *UAS*-SmoΔC2 y *UAS*-SmoΔN (Jia, 2004; Nakano, 2004). Moscas *UAS*-hhi proporcionadas por el National Institute of Genetics (Mishima, Japan) stock center. Las líneas no descritas en el texto se pueden encontrar en Flybase (Flybase Consortium 2005). Si no se especifica lo contrario, los cruces se realizaron a 25°C.

## 8.- GENERACIÓN DE LOS CLONES POR RECOMBINACIÓN FLP-FLP.

Se indujeron clones de células que expresan hh o Gprk2i y hh mediante un choque térmico de 10 minutos en larvas de genotipo *hsFLP; abx/Ubx<f>lacZ-Gal4/UAS-hh* y *hsFLP; abx/Ubx<f>lacZ-Gal4/UAS-hh UAS-Gprk2i*, respectivamente. La eliminación del casete f<sup>+</sup> por recombinación mediada por FLP permite la expresión de un gen *lacZ-Gal4* dicistrónico. Los clones fueron identificados por la expresión de β-gal.

Las alas homocigóticas para *smo*<sup>2</sup> fueron generadas en individuos *Gal4-638/+;FRT42 smo<sup>2</sup>/FRT42 M (2)<sup>R</sup>; UAS-FLP/+*.

Los clones homocigotos *Df(3R)Gprk2 M<sup>+</sup>* fueron inducidos en larvas de genotipo *hsFLP1.22; FRT82 Df(3R)Gprk2 / FRT82 M (3)w Ubi-GFP*. Las células homocigotas *Df(3R)Gprk2* se reconocieron en los discos de ala por la ausencia de marcadores GFP.

Todos estos ensayos fueron realizados por la Dra. Cristina Molnar del laboratorio de J. F. De Celis.

## 9.- PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS PURIFICADOS.

### 9.1.- Proteínas de fusión a GST.

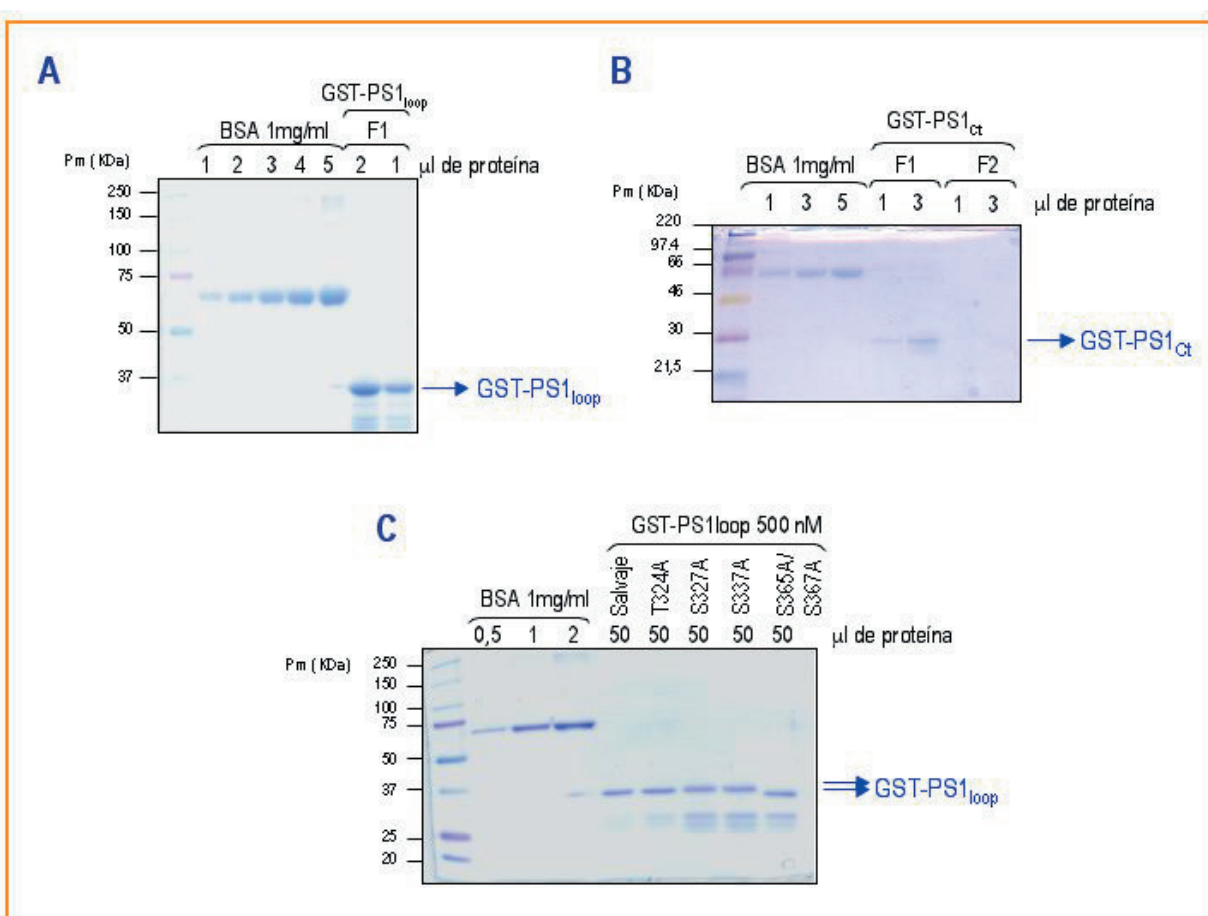
Las proteínas de fusión GST-PS1<sub>loop</sub> (aminoácidos 295-374), GST-PS1<sub>Ct</sub> (aminoácidos 454-467) (**figura MyM 8**) y GST-Gprk2<sub>Nt</sub> (aminoácidos 153-260) se purificaron según el método estándar que describimos brevemente: se transforman dichas construcciones en bacterias competentes BL21 de *E.coli* y se crecen durante toda la noche a 37°C en medio LB con ampicilina 100 µg/ml.

Pasadas 14-16 h, las bacterias se diluyen con medio LB suplementado con sacarosa y se dejan crecer hasta alcanzar una D.O.<sub>660nm</sub> de 0,6. La expresión de la proteína se induce con la adición al medio de IPTG 1mM durante 3-5 h a 37°C. Las bacterias se sedimentan y se lisan en Tris-HCl 10 mM pH8, Triton X-100 1%, lisozima 2 mg/ml e inhibidores de proteasas (benzamidina 10µg/ml, aprotinina 1,4 µg/ml, PMSF 200 µM, inhibidor de tripsina 10 µg/ml), tras lo cual el lisado bacteriano se sonica y clarifica. El sobrenadante se carga en una columna de Glutation-sefarosa 4B (Amersham Biosciences) (50:4) y se deja pasar durante un mínimo de 3 horas, se lava la columna con PBS y se eluyen las proteínas con 50 mM Tris-HCl pH8, 5 mM Glutation reducido (Sigma). La pureza y la concentración de las proteínas obtenidas se comprueban en geles desnaturalizantes de SDS-poliacrilamida (apartado 11.1). Se incluyen geles representativos de las proteínas purificadas (**figura MyM 8**).

El origen de los plásmidos que codifican estas proteínas se especifica en el apartado 2.11.3.

La purificación de las proteínas de fusión a GST de los mutantes del bucle citoplasmático de PS1 Thr324 (GST-PS1<sub>loop</sub> T324A), Ser327 (GST-PS1<sub>loop</sub> S327A), Ser337 (GST-PS1<sub>loop</sub> S337A) y Ser365/Ser367 (GST-PS1<sub>loop</sub> S365,367A) (**figura MyM 8**) se ha realizado con el Profinia™ Protein Purification System (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones de la casa comercial, realizando el crecimiento bacteriano, la inducción con IPTG y el lisado celular igual que en el caso anterior. La generación de los mutantes se describe en el apartado 2.5.





**FIGURA MyM 8.- PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN A GST DE DISTINTOS DOMINIOS DE PS1 Y SUS MUTANTES.**

Las proteínas de fusión a GST se purificaron a partir de la fracción soluble, siguiendo protocolos estándar de obtención de proteínas de fusión, mediante cromatografía de afinidad en columnas de glutation-Sefarosa (ver apartado 9.1 de MyM). Alícuotas de la elución con Glutation se resolvieron en geles de SDS-poliacrilamida al 12%. La figura muestra la tinción con Azul Brillante de Coomassie de la purificación de GST-PS1<sub>loop</sub> silvestre (A), GST-PS1<sub>ct</sub> (B) y los distintos mutantes de GST-PS1<sub>loop</sub> señalados en la figura (C). De forma paralela se corrieron distintas cantidades de BSA para la cuantificación posterior de las proteínas purificadas (junto a la medida de Bradford).

## 9.2.- Generación de proteínas recombinantes por baculovirus.

### 9.2.1.- GRK2, GRK5 y GRK6.

La infección de células Sf9 con baculovirus de GRK2 bovina y GRK5 y GRK6 humana fue llevada a cabo, esencialmente, como se describe en *Murga, 1996* a partir de células Sf9 infectadas con construcciones de GRK2, GRK5 y GRK6 en baculovirus.

## 9.3.- Rodopsina.

La rodopsina se purifica a partir de retinas bovinas según el método descrito por *Shichi (1978)* y por *Wilden (1982)*. Se obtiene así una preparación en la que la rodopsina supone más del 90% de la proteína (evidenciado por tinción con azul de Coomassie).

## 10.- GENERACIÓN DEL ANTICUERPO ANTI Gprk2 N-terminal (aminoácidos 153-260).

La proteína purificada GST-Gprk2<sub>Nt</sub> se corrió en un gel de SDS-poliacrilamida al 12%. La banda correspondiente a la proteína se pulverizó en nitrógeno líquido y se hicieron alícuotas de 300 µg de proteína.

Para obtener los anticuerpos contra el fragmento proteico se sometió a dos conejos (*Oryctolagus cuniculus*) a una serie de inmunizaciones con las proteínas. En un primer inóculo se utilizó una emulsión de 900 µg de proteína con el coadyuvante de Freund completo (Sigma Inmuno Chemicals) (relación 1:1). Tras este primer proceso de inmunización se realizaron hasta tres más, en este caso preparando la emulsión con coadyuvante de Freund incompleto (Sigma Inmuno Chemicals), inoculando cada 15 días. Previamente a los procesos de inmunización, se realizó una extracción de sangre preimmune como control negativo.

Tras el sangrado de los animales se obtuvo el suero por centrifugación de la sangre a 3000 rpm 15 minutos y el sobrenadante se guardó a -20°C añadiéndole azida 0.02% (apartado 11.12.3. Currents Protocols in Molecular Biology).

## 11.- ELECTROFORESIS.

### 11.1.- Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida.

#### 11.1.1.- Geles unidimensionales.

Se utilizaron geles de SDS-poliacrilamida según el método descrito por *Laemmli, 1970* cuyos porcentajes de acrilamida-bisacrilamida oscilaban entre 6 y 15%, en función de la resolución requerida por el experimento. Como patrones de peso molecular se emplearon las proteínas miosina (200 KDa), β-galactosidasa (116,25 KDa), fosforilasa B (97,4 KDa), albúmina de suero bovino (66,2 KDa), ovoalbúmina (45 KDa), anhidrasa carbónica (31 KDa), inhibidor de tripsina de soja (21 KDa) y lisozima (14 KDa) (Bio-Rad).

En algunos casos, los geles se tiñeron con Azul Brillante de Coomassie siguiendo el protocolo descrito por *Harlow, E. y Lane, D. (1988) "Antibodies: a laboratory manual" Cold Spring Harbor Laboratory*. Tras resolver las proteínas, el gel puede someterse a autorradiografía, si las proteínas están marcadas con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, o a la amplificación de la señal incubando 20 min. con Amplify (Amersham), si las proteínas están marcadas con [<sup>35</sup>S]-metionina. En ambos casos se requiere un paso de fijación en metanol:acético (50:10) durante 20 minutos y se procede a secar el gel y a exponerlo con una película de rayos X AgfaCurix RP2 de 100 NIF.

#### 11.1.2.- Geles bidimensionales.

La electroforesis bidimensional es una técnica de alta resolución cuyo objetivo es la separación de mezclas de proteínas altamente complejas. Es también una técnica adecuada para la separación de isoformas de proteínas que difieran en su punto isoelectrico o para la separación de proteínas con modificaciones post-traduccionales, como por ejemplo la fosforilación, que impliquen diferencias en el punto isoelectrico de las especies. En primer lugar, las proteínas se separan en un gel con gradiente de pH, en condiciones desnaturizantes, de acuerdo con su punto isoelectrico (isoelectroenfoque, IEF). Tras una etapa de equilibración/reducción/alquilación, las proteínas del gel de isoelectroenfoque se separan de acuerdo con su masa molecular por electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).

## MATERIALES Y MÉTODOS

En nuestro caso la primera dimensión (IEF) se realizó en IPGs (immobilized pH gradients) de amplio rango no lineal de pH (Immobiline TM DryStrip pH 3-10 NL de 18 cm, Amersham Biosciences, hoy: GE Healthcare) en un aparato de electroforesis horizontal (Ettan IPGphor II, Amersham Biosciences) según el método descrito por Görg, 1999. Las muestras se precipitaron con 4 volúmenes de acetona a -20°C durante toda la noche y se resuspendieron en tampón de lisis IEF: 7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 50mM Tris-HCl pH 8.8, 0.5% IPG buffer 3-10 (anfolitos) y 50mM DTT. La rehidratación de la muestra en las IPGs se realizó de manera activa para mejorar la entrada de proteínas de gran tamaño.

La primera dimensión se inició aplicando la siguiente secuencia de voltajes:

IEF Params: 50µA/Strip at 20 °C

Step 1: Step	30V	5:00 Hr
Step 2: Step	60V	5:00 Hr
Step 3: Step	120V	1:00 Hr
Step 4: Step	200V	1:00 Hr
Step 5: Step	500V	1:00 Hr
Step 6: Step	1000V	0:30 Hr
Step 7: Grad	8000V	0:30 Hr
Step 8: Step	8000V	50000 Vhr
Step 9: Step	500V	5:00 Hr

Una vez desarrollado el IEF, las IPGs se equilibraron en tampón de equilibrado: 6M urea, 2% SDS, 50mM Tris-HCl pH 8.8, 30% glicerol, las proteínas se redujeron con 65mM DTT durante 15 min. y se alquilaron con 135mM IA durante 15 min. a temperatura ambiente. La segunda dimensión se realizó en geles SDS-PAGE al 12%. Los geles se corrieron a 1-3W/50-150V/15-20mA durante 18 horas. Los geles 2D se tiñeron con 0,1 % de Azul Brillante de Comassie en etanol al 40% y ácido acético al 10% durante 3 horas, siendo desteñidos en etanol al 30% y ácido acético al 10%.

### 11.1.3.- Geles de bicina.

Para la detección del dominio intracelular de APP (AICD) en geles de bicina se siguió el protocolo de Wiltfang, 1997. En resumen, los geles de bicina constan de tres fases:

- separador: 0,4M Tris, 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, glicerol 17% y acrilamida 14,25%.
- concentrador: 0,4M Bis-Tris, 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y acrilamida 5,7%.
- “comb”: tampón comb (0,36M Bis-Tris, 0,1M Bicina) y acrilamida 7,12%.

En todos los casos se parte de acrilamida:bisacrilamida (57:3) y se utiliza la cantidad necesaria para obtener los porcentajes indicados en cada fase. El resto de los componentes se utilizan a la misma concentración que en los geles SDS-poliacrilamida normales. Las muestras se disuelven en tampón de muestra bicina (0,36M Bis-tris, 0,16M Bicina, 1% p/v SDS, 15% p/v sacarosa, 2,5% v/v 2-mercaptoetanol, 0,004% p/v azul de bromofenol). La electroforesis se lleva a cabo utilizando el tampón catódico (0,2M Bicina, 0,1M NaOH, 0,025% SDS) y anódico (0,2M Tris, 0,05M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), a 60 V durante 15 minutos, transcurridos los cuales se aumenta el voltaje a 100 V durante 1 hora más, a temperatura ambiente. En este caso se utilizó el patrón de bajos pesos moleculares Novex® Sharp Pre-Stained Standard.



### 11.2.- Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa-TAE.

La separación de fragmentos de DNA se realizó en geles de agarosa de desarrollo horizontal del 1-4%. El tampón de electroforesis utilizado es TAE (Tris-acético 40mM, EDTA 2mM) y el tampón de carga de las muestras es glicerol al 50%, EDTA 1mM, azul de bromofenol al 0,4% y azul de xileno al 0,4%. Los patrones de peso molecular fueron los fragmentos de digestión enzimática con HindIII de los fagos  $\lambda$  y  $\phi$ 29 (suministrados por el servicio de fermentación del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa).

### 12.- MARCAJE METABÓLICO CON [ $^{35}$ S]-Met-Cys.

Las células se crecieron hasta un 80% de confluencia en placas p60 y se incubaron, durante 2 horas, en su medio habitual libre de metionina, cisteína y suero. Posteriormente, el medio se reemplazó por 0,5 ml de DMEM libre de metionina suplementado con 0,5 mCi/ml de [ $^{35}$ S]-Protein Labeling Mix (NEN) y se incubaron los tiempos indicados en los pies de figura (entre 15 minutos en ensayo de vida media y 2-4 horas en ensayos de marcaje de la proteína) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> ("pulso"). Tras el marcaje, las células se lavaron con PBS y se incubaron en medio de cultivo normal (DMEM 10% suero) durante los tiempos indicados ("caza"). Finalmente, las células se lavaron con PBS en frío, se lisaron en el tampón indicado y las proteínas de interés se inmunoprecipitaron tal y como se especifica en el apartado 15.2.

### 13.- ENSAYOS DE FOSFORILACIÓN.

#### 13.1.- Fosforilación de proteínas recombinantes.

Estos ensayos se realizaron en 50  $\mu$ l tampón de fosforilación (Tris-HCl 20mM pH7.5, MgCl<sub>2</sub> 6mM, EDTA 1.4 mM, EGTA 1mM, NaF 4.5 mM y ATP 80  $\mu$ M), utilizando las proteínas de fusión GST-PS1<sub>loop</sub> (295-374) (bucle citoplasmático, figura MyM 8) o GST-PS1<sub>Ct</sub> (454-467) (carboxilo terminal citosólico, **figura MyM 8**) a una concentración de 100 nM, GST-PS1<sub>loop</sub> mutantes a 10 y 25 nM, la rodopsina a 20 nM, DREAMHis6 a 25 y 50 nM, GST-DREAM a 50 nM, 10  $\mu$ g de fosvitina y GRK2 a 50nM o distintas concentraciones indicadas en cada caso. En algunos casos (indicados en los pies de figura) se incluyó heparina (Calbiochem), inhibidor de GRK2, a una concentración de 0,8  $\mu$ M. La mezcla se incubó durante 30 minutos (o tiempos indicados en el curso temporal o en los ensayos de saturación) a 30 °C y la reacción se detiene añadiendo 50  $\mu$ l de tampón de carga de electroforesis. Las muestras se procesan en geles SDS-poliacrilamida al 10-12% y las proteínas fosforiladas se detectan por autorradiografía.

La cuantificación se realiza o por densitometría láser de las películas (Molecular Dynamics 300<sup>a</sup> Computing Densitometer) o, en los casos en los que se quiere determinar la estequiometría de la reacción, las bandas correspondientes al sustrato (DREAM, PS1) se escinden del gel y se cuantifica su radiación por el método de Cerenkov (*Mathews, 1968*).

#### 13.2.- Desfosforilación de proteínas recombinantes.

Los ensayos de desfosforilación por calcineurina se iniciaron por adición, tras el ensayo de fosforilación de DREAM por GRK2 (ver **figura R 9**), de tampón de calcineurina 2X (Tris-HCl 20 mM pH7,5, NaCl 200mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, DTT 2mM, BSA 2mg/ml) con 1,6  $\mu$ M heparina, en presencia o ausencia de 1,5 mM de Ca<sup>2+</sup>, 6,7 mg/ml de calmodulina y 10 unidades de calcineurina durante 1h a 30°C (*Ruiz-Gomez, 2007*). La reacción se detiene añadiendo 50  $\mu$ l de tampón de carga de electroforesis. Las muestras se procesan en geles SDS-poliacrilamida al

## MATERIALES Y MÉTODOS

10-12% y las proteínas fosforiladas se detectan por autorradiografía, cuantificándose el nivel de fosforilación, como se indica en el apartado 13.1, por densitometría o conteo directo de la banda fosforilada.

### 14.- IDENTIFICACIÓN DEL SITIO DE FOSFORILACIÓN MEDIANTE “FRAGMENTACIÓN DE PÉPTIDOS MS/MS” (realizado en el Servicio de Proteómica del CBMSO).

Las proteínas de interés, digeridas “in situ” con tripsina, se secan y se resuspenden en ácido fórmico al 0.1% en agua para su posterior análisis LC/RP-MS (cromatografía líquida en fase reversa-espectrometría de masas) en un espectrómetro de masas de tipo electrospray acoplado a trampa iónica (ESI-IT) modelo Deca-XP (Thermo-Finnigan, San José, California, USA) empleando una columna de 180  $\mu$ m de diámetro interno, a un flujo de 1,5  $\mu$ l/m en modo micro-spray con una interface “metal needle-kit” (Thermo-Finnigan). El método empleado es modo SIM: (Monitorización de iones sencillos) de tal modo que el instrumento aísla y fragmenta la masa de iones concretos.

De esta forma se pueden identificar péptidos con modificaciones y estudiar el sitio/aminoácido modificado, analizando el espectro ms/ms obtenido. En nuestro caso concreto se analizó el fosfopéptido m/z 494,7. El detector IT se programó para aislar y fragmentar la masas de los iones con doble carga correspondientes al posible fosfopéptido.

### 15.- INMUNO-PROTOCOLOS

#### 15.1.- Inmunodetección tras electroforesis.

Las muestras para el análisis (proteínas purificadas, lisados o fracciones subcelulares, etc) se resuelven en geles de SDS-poliacrilamida junto con patrones de peso molecular comerciales (Bio-Rad). Las proteínas así separadas se transfieren a un filtro de nitrocelulosa (Transblot de Bio-Rad) mediante transferencia líquida en tampón carbonato pH10 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3mM,  $\text{NaHCO}_3$  10 mM, 20% metanol pH10) durante 75 min. a 50V, en el caso de los geles de 12x14 cm (utilizando un Trans-Blot Cell de Bio-Rad), o bien a 30V durante 90 min.

En el caso de los geles de bicina, las proteínas se transfieren a un filtro de Immobilon PVDF, previamente activado 1 min. en metanol, siguiendo el protocolo descrito para los geles de SDS-poliacrilamida. En este caso, tras la transferencia, la membrana se hierve 3 min. en PBS.

Después de teñir la membrana con rojo Ponceau, para comprobar la transferencia de proteínas a la membrana, se incuba durante una hora a temperatura ambiente en medio TBS (Tris-HCl 10mM pH 7,5, NaCl 150mM) suplementado con leche en polvo desnatada (Molico) al 5% o BSA al 3%, con objeto de bloquear los posibles sitios de unión inespecífica. Tras descartar el medio de bloqueo, la membrana se pone en contacto con el anticuerpo correspondiente, diluido en medio TBS con 3% de BSA, durante toda la noche a 4°C. Antes de incubar con el anticuerpo secundario, durante dos horas a temperatura ambiente, se lava la membrana tres veces (3x15min.) con TBS-Tween 20 al 0,15 %. Estos lavados se repiten una vez que ha terminado la incubación con el anticuerpo secundario (anti-inmunoglobulina de conejo unido a peroxidasa, cuando el anticuerpo primario es policlonal, y anti-inmunoglobulina de ratón para los monoclonales, ambos de Nordic Immunology diluidos 1:50.000, y anti-cabra de burro en el caso del anticuerpo de actina (1:25000)). Finalmente, para el revelado se emplea un método quimioluminiscente en el que la peroxidasa, acoplada al anticuerpo secundario, cataliza la oxidación del sustrato luminol en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (ECL, Amersham).

La cuantificación de la señal se realiza por densitometría láser (GS-710 Calibrated Imaging Densitometer BioRad).

## 15.2.- Inmunoprecipitación.

Esta técnica se ha aplicado esencialmente en el estudio “in situ” de interacciones proteína-proteína. En el caso de las inmunoprecipitaciones de las proteínas sobreexpresadas PS1 y DREAM, las células se lisaron, 48 horas después de la transfección, en 600  $\mu$ l/P-100 de tampón de lisis NP-40, en el caso de DREAM, o CHAPSO, en el caso de PS1, (Tris-HCl 50mM pH 7.4, NaCl 150mM, NP-40 0,5% o CHAPSO 1%), junto con una mezcla de inhibidores de proteasas (STI y benzamidina 100  $\mu$ g/ml, PMSF 200  $\mu$ g/ml y aprotinina 8  $\mu$ g/ml) durante 2 horas a 4°C con rotación permanente. La mezcla se clarifica de restos celulares por centrifugación a 4°C durante 15 min a 14000xg. Para la inmunoprecipitación, el sobrenadante, diluido 3 veces en tampón de lisis sin detergente, se incubó con 1mg/ml de BSA y la dilución correspondiente del anticuerpo requerido (apartado 15.4), con rotación permanente, durante 16 horas a 4 °C. Al día siguiente, se añadieron 30  $\mu$ l al 50% de proteína A-Sefarosa (SIGMA) o proteína G-Sefarosa (Zymed), según el anticuerpo sea policlonal o monoclonal, respectivamente, y se incubó a 4°C durante 2 horas o más. Este paso se omitió cuando los anticuerpos estaban covalentemente unidos a las resinas (anti-myc-agarosa, Santa Cruz). Se recogieron los complejos inmunes por centrifugación (5 min, 3000xg) y, tras descartar el sobrenadante, se lavaron 5 veces con 10 ml del tampón de lisis. Las proteínas inmunoprecipitadas se resuspendieron en 20  $\mu$ l de tampón de muestra de electroforesis y se cargó toda la muestra en un gel de poliacrilamida-SDS del porcentaje adecuado. Posteriormente el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para la detección de las proteínas de interés mediante “western blot”.

Para la inmunoprecipitación de las proteínas endógenas PS1 y GRK2, se emplearon placas p150, con una confluencia celular del 80%, que fueron lisadas en 1ml de tampón de lisis PD (Tris-HCl 40mM, NaCl 500mM, EDTA 6mM, EGTA 6mM, DTT 1mM y 1% CHAPSO), junto con ortovanadato (VaO<sub>4</sub>) 0,3 mM, NaF 10mM y una mezcla de inhibidores de proteasas (STI 10 mg/ml, benzamidina 100  $\mu$ g/ml, PMSF 200  $\mu$ g/ml y aprotinina 8  $\mu$ g/ml). Para la inmunoprecipitación se incubaron 2 mg de proteína total con 1mg/ml de BSA y el anticuerpo correspondiente (apartado 15.4). Se continuó siguiendo el protocolo explicado anteriormente.

## 15.3.- Inmunofluorescencia.

### 15.3.1.- Inmunofluorescencia de células.

Los cubreobjetos de 25mm X 25mm se sumergieron en etanol y se flamearon, para su esterilización, antes de colocarlos en pocillos de placas p24 y cubrirlos con poli-L-lisina, durante 20-30 minutos bajo luz ultravioleta. A continuación, se eliminó la poli-L-lisina y los cristales se lavaron tres veces con PBS. Las células N2a y S2 se sembraron y se transfectaron sobre los cristales, como se detalla en el apartado 3.4. Transcurridas 36 horas de la transfección, las células se fijaron con formaldehído 3,7 % durante 30 min a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con PBS y se bloquearon en PBS completo con BSA 5% y NP-40 al 0.5%. Posteriormente, las células se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes, a las diluciones señaladas en los pies de figura y en el apartado 15.4, durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces con PBS, se llevó a cabo la incubación con un anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina de conejo unido al fluoróforo (Donkey anti-rabbit Alexa 488 o 555, dilución 1:500 Invitrogen), cuando el anticuerpo primario es policlonal, y anti-inmunoglobulina de ratón unido al fluoróforo (Donkey anti-mouse Alexa 488 o 555, dilución 1:500, Invitrogen), cuando el anticuerpo es monoclonal, durante 1 hora a temperatura ambiente protegidos de la luz. Los cristales deshidratados con

## MATERIALES Y MÉTODOS

distintas concentraciones de etanol, se montaron sobre portaobjetos con medio de montaje (Fluoromount-G), se dejaron secar y se sellaron con esmalte. Las células se visualizaron por microscopía confocal (Microscopio confocal LSM510 vertical) utilizando objetivos de 63 y 100X en el servicio de microscopía confocal del CBMSO. Las proteínas marcadas con Alexa 488 se visualizan empleando el láser Argón/2 y la proteínas marcadas con Alexa 555 empleando el láser HeNe1. El tratamiento posterior de la imagen se realizó con el programa LSM y "Adobe Photoshop".

### 15.3.2.- Inmunohistoquímica de discos imaginales de *Drosophila*.

Las larvas de estadio 3, se disectaron en PBS y se fijaron durante 20 minutos en paraformaldehído al 4% en PBS. Se lavaron tres veces (3 x 15 min.) en PBT (PBS + Tritón X-100 0,3%) y, posteriormente, se bloquearon en PBT-BSA 1% durante 30 minutos. A continuación, los discos se incubaron durante toda la noche a 4°C con el/los anticuerpos primarios en PBT/BSA. Después de varios lavados en PBT durante 45 min., los discos se incubaron con los anticuerpos secundarios, unidos a distintos fluoróforos, durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Tras tres lavados (3 x 15 min.) en PBT, los discos se montaron en medio de montaje especial para fluorescencia (Citifluor). Las muestras se visualizan por microscopía confocal (Microscopio confocal Microradiance) del servicio de microscopía confocal del CBMSO. Las imágenes se procesaron con el programa Metamorph y se trataron con el programa Adobe Photoshop.

### 15.3.3.- Inmunohistoquímica de embriones de *Drosophila*.

Estos ensayos se realizaron bajo la supervisión y con la ayuda de la Dra. Mar Ruiz Gómez. La fijación de los embriones se basa en el protocolo descrito por *Goriely, 1991*. Los embriones se obtienen de puestas de una duración y temperatura adecuada en función del estadio embrionario requerido para el experimento. Posteriormente los embriones se recogen, se decorionan con hipoclorito de sodio de 1-2 min, se lavan con agua y se elimina el exceso de líquido. Estos embriones se resuspenden en heptano y se pasan a una solución de fijación que es una mezcla de 1ml de heptano/ 1ml fijador recién preparado (PBS-formaldehído 20%), con la que se incubarán alrededor de 20 minutos. Una vez fijados, se desvitinizan reemplazando la fase acuosa por metanol, en el que pueden conservarse indefinidamente a -20° C.

Tras el proceso de fijación se realiza un proceso de inmunodetección (basado en el protocolo descrito en *Ruiz-Gómez, 1993*). Los embriones previamente fijados se hidratan con una serie de lavados en PBT (PBS-Tritón X100 al 0'3%). Posteriormente los embriones se bloquean 30 min con PBT-BSA 1%. Los embriones bloqueados se incuban con diluciones del anticuerpo preabsorbido (1/50, 1/100, 1/250, 1/500) diluido en PBT-BSA1% durante toda la noche a 4° C. Después de retirar los anticuerpos y lavar los embriones, se repite el proceso de bloqueo y los embriones se incuban con el anticuerpo secundario biotinilado durante 1 hora. Para revelar se procede al lavado previo de los embriones y se trata durante 30 min con ABC Elite kit (Vectorlabs) y se vuelve a lavar y revelar con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1%. Finalmente los embriones se deshidratan progresivamente en EtOH, se embeben en una mezcla epón/ acetona (1:1) y se montan en epón. Las imágenes se tomaron con el microscopio Axiophot (Zeiss) y la fotografiados con una cámara es LEICA DFC300 y se procesaron con "Photoshop".

## 15.4.- Anticuerpos utilizados.

- *Anticuerpo anti-actina* (I-19) (Santa Cruz Biotechnology): anticuerpo policlonal contra el dominio C-terminal de actina humana. En inmunodetección se ha utilizado a una dilución 1:600.
- *Anticuerpo anti-Amyloid Precursor Protein (APP)* (SIGMA). Anticuerpo comercial desarrollado en conejo

usando un péptido sintético correspondiente al dominio C-terminal del APP humano (676-695). Se utilizó en inmunodetección a una dilución 1:4000.

- *Anticuerpo anti-Blistered/DSRF*. Anticuerpo desarrollado en rata contra el dominio amino terminal de DSRF/Blistered (aminoácidos 25-246) (Affolter, 1994). En inmunohistoquímica se utilizó a una dilución 1:200.

- *Anticuerpo anti-Caupolican* (Gómez-Skarmeta, 1996). Dilución 1:200 en inmunohistoquímica.

- *Anticuerpo anti-Cubitus interruptus* (Aza-Blanc, 1997). Se ha utilizado en inmunohistoquímica a una dilución 1:10.

- *Anticuerpo anti-DREAM* (Ab1014; Link, 2004): anticuerpo monoclonal proporcionado por el Dr. Naranjo (Centro Nacional de Biotecnología). En inmunodetección se ha utilizado a una dilución 1:10000 y para inmunoprecipitación a una dilución 1:250.

- *Anticuerpo anti-Engrailed* (Iowa Developmental Hybridoma Bank, Iowa City, IA). En inmunohistoquímica se utilizó a una dilución 1/50.

- *Anticuerpo anti-Knot* (Crozatier, M. 2002). En inmunohistoquímica se ha utilizado a una dilución 1/50.

- *Anticuerpo anti-Gprk2*. Generado en nuestro laboratorio contra el dominio N-terminal de Gprk2 (aminoácidos 153-260), ha sido utilizado principalmente en ensayos de inmunodetección a una dilución 1:500. En inmunofluorescencia se ha usado a una dilución 1:100.

- *Anticuerpo GRK2/3* (Upstate Biotechnology). Anticuerpo monoclonal comercial contra la proteína GRK2 completa. Se utilizó para inmunoprecipitar a una dilución 1:250 y para inmunofluorescencia a una dilución 1:500.

- *Anticuerpo GRK2* (Santa Cruz Biotechnology): Anticuerpo de conejo policlonal diseñado contra el dominio C-terminal de GRK2 de origen humano. Ha sido utilizado para inmunodetección a una dilución 1:500.

- *Anticuerpo anti-GST B14* (Santa Cruz Biotechnology). Anticuerpo de ratón monoclonal contra glutathione-S-transferase (GST) recombinante *Schistosoma japonicum* y contra la proteína de fusión GST expresada en *E.coli*. En inmunodetección se utilizó a una dilución 1:500.

- *Anticuerpo anti-myc* (Santa Cruz Biotechnology, INC.). Anticuerpo monoclonal desarrollado contra el epítipo correspondiente a los aminoácidos 408-439 localizado dentro del dominio C-terminal de la proteína Myc de origen humano. El anticuerpo c-myc (9E10) se ha utilizado en inmunodetección a una dilución 1:200 y el anticuerpo c-myc-agarosa (9E10:sc40) ha sido utilizado para inmunoprecipitar a una concentración de 1-2 µg/100-500 µg de proteína.

- *Anticuerpo anti-myc* (Híbridoma). El anticuerpo reconoce el epítipo 9E10 (EQKLISEEDL) derivado de la proteína humana c-myc. Se ha utilizado en inmunofluorescencia a una dilución 1:500.

- *Anticuerpo anti-Patched* (Iowa Developmental Hybridoma Bank, Iowa City, IA). Dilución 1/50 en inmunohistoquímica.

- *Anticuerpo policlonal PF1*, generado en nuestro laboratorio, contra una proteína de fusión N-terminal PF1 (aminoácidos 50-145 de GRK2 bovina), ha sido utilizado principalmente en ensayos de inmunodetección a una dilución 1:1000.

- *Anticuerpo policlonal PF2* generado en nuestro laboratorio contra el epítipo C-terminal de GRK2 (comprende los aminoácidos 436-689). Se utiliza para inmunodetección a una dilución 1:600 y en inmunoprecipitación a 1:500.

- *Anticuerpo anti-Presenilin1 (H-70)* (Santa Cruz Biotechnology). Es un anticuerpo policlonal de conejo (aminoácidos 1-70) de la proteína recombinante PS1. Ha sido utilizado para inmunodetección a una dilución 1:500, para inmunoprecipitación a una dilución 1:250 y para inmunofluorescencia a 1:500.

- *Anticuerpo anti-Presenilin1-loop* (Calbiochem). Anticuerpo policlonal que reconoce los aminoácidos 263-407 localizados en el bucle citoplasmático de presenilina 1 humana. Ha sido utilizado en inmunodetección a una dilución 1:5000 y en inmunofluorescencia a una dilución 1:500.

- *Anticuerpo policlonal anti-Presenilin* (Abcam): Anticuerpo policlonal de conejo contra un péptido sintético correspondiente a los aminoácidos 2-15 de presenilina 1 humana. Ha sido utilizado principalmente en ensayos de



## MATERIALES Y MÉTODOS

inmunodetección 1:1000.

- *Anticuerpo Sall (de Celis, 1999)*. Dilución 1/50 en inmunohistoquímica.
- *Anticuerpo anti-Smoothed* (Iowa Developmental Hybridoma Bank, Iowa City, IA). Dilución 1:50 en inmunohistoquímica.

### 16.- ENSAYOS DE INTERACCION “IN VITRO”.

Se utilizaron las distintas proteínas de fusión disponibles de PS1 (GST-PS1<sub>Ct</sub> y GST-PS1<sub>loop</sub>), GST-DREAM, así como la proteína de fusión control (GST) y GST-Gly. Las proteínas, a una concentración de 100 nM se inmovilizaron en la resina glutation-sefarosa 4B en 100 µl de tampón de unión (Tris-HCl 20 mM pH7,4, NaCl 150mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, Tritón X-100 al 1%, BSA al 0,01% e inhibidores de proteasas). Posteriormente estas preparaciones se incubaron con GRK2 recombinante (purificada células Sf9 infectadas con baculovirus, ver apartado 9.2.1) a una concentración de 50 nM durante 30 minutos a 4°C en tampón de unión o con 500 µg de lisado total de cerebro de rata, en un volumen final de 200 µl. Después de lavar, al menos 3 veces, con 1 ml de tampón de lavado (Tris-HCl 20mM pH7.4, NaCl 300mM, 2mM EDTA pH7,4, Tritón X-100 al 0,05 %.). La resina, junto a las proteínas retenidas, se resolvió por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida y las muestras se detectaron por inmunodetección tras electrotransferencia (ver apartado 15.1).

### 17.- ENSAYO DE ACTIVIDAD LUCIFERASA.

#### 17.1.- Medida de la actividad luciferasa.

Para el ensayo de actividad luciferasa se siguió el protocolo del Luciferase Assay Kit (Promega). Se sembraron 1x10<sup>6</sup> células HEK-293 C99-Gal4VP16 por pocillo de p6, pre-tratado con poli-L-Lisina. Al día siguiente, las células se transfectaron con 2 µg de DNA. Transcurridos 36 horas desde la transfección, las células se lisaron en 200 µl de tampón de lisis luciferasa 1x/pocillo p6 y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los tubos se agitaron en vortex durante 10-15 segundos y se centrifugaron a 12.000xg durante 2 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos e, inmediatamente, se midió la actividad luciferasa mediante un Monolight<sup>®</sup>2010 (Analytical Luminiscence Laboratory, San Diego, CA).

#### 17.2.- Medida β-gal.

Sobre 25 µl de cada muestra (por duplicado), obtenida como se detalla en el apartado anterior, se añadieron 25 µl de tampón β-gal 2x (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 120mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 80 mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, β-mercaptoetanol 100mM y ONPG 1,33 mg/ml) y la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente hasta la aparición de color. La reacción se detuvo por adición de 50 µl de tampón carbonato sódico 1,2 M y la densidad óptica se midió a 405 nm en un iMark Microplate Reader (Bio-Rad).

### 18.- MEDIDA DE PROTEÍNAS.

La determinación de proteínas se realizó por el método de *Bradford* (Bradford, 1976) o por el método de *Lowry* (Lowry, 1951), modificado para la medida de muestras con detergentes, utilizando albúmina de suero bovino como estándar para construir la recta patrón.

## 19.- TRATAMIENTO MATEMÁTICO Y ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.

Los experimentos se realizaron, como mínimo, tres veces y en general los puntos se llevaron por duplicado o triplicado. Los datos se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar de la media ( $\pm$ SEM), excepto que se indique lo contrario en los pies de figura.

Para los cálculos de las constantes cinéticas de las reacciones enzimáticas, se asumió el comportamiento de Michaelis-Menten de las quinasas. Se confeccionaron los gráficos con el programa de Excel de ajuste de mínimos cuadrados y se pasaron a calcular los parámetros cinéticos: constante de Michaelis-Menten (Km) y velocidad máxima (Vmax).

El análisis estadístico se realizó mediante el test de prueba "t de student bilateral" (de dos colas) y n-1 grados de libertad donde la hipótesis nula es que no existe diferencia significativa entre la situación o condición cuya significatividad estadística queremos determinar y la situación control o basal. El valor correspondiente a la probabilidad del cumplimiento de la hipótesis nula (P) obtenido en cada caso varió de  $P < 0.1$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*) o  $P < 0.001$  (\*\*\*), como se detalla en las figuras.





## RESULTADOS



## 1.- FOSFORILACIÓN DE DREAM POR MIEMBROS DE LA FAMILIA DE QUINASAS DE RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GRKs): REGULACIÓN DEL TRÁFICO DE MEMBRANA DE LOS CANALES DE POTASIO KV4.2.

Como hemos mencionado en la introducción, la proteína DREAM ha recibido distintos nombres en función de su identificación por grupos diferentes. Calsenilina fue la primera en ser identificada, mediante el sistema de doble híbrido, como una proteína que interacciona con el fragmento CTF de presenilinas (PSs) de forma independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Buxbaum, 1998). Posteriormente, el grupo del Dr. José Ramón Naranjo del Centro Nacional de Biotecnología (CNB), describió DREAM como una proteína que interacciona con elementos de respuesta a dinorfina (DRE) en ausencia de calcio, reprimiendo la transcripción (Carrion, 1999). Por último, utilizando el extremo amino terminal de los canales de potasio de tipo A se identificaron dos proteínas a las que llamaron KChIP-1 (potassium channel interacting protein-1) y KChIP-2. La búsqueda de secuencias homólogas a estos genes en la base de datos de cDNA, permitió identificar a Calsenilina / DREAM como KChIP3 (An, 2000).

En la búsqueda de nuevas proteínas que interaccionasen con DREAM, el grupo dirigido por J. R. Naranjo (CNB) identificó, mediante el sistema del doble híbrido, a la quinasa GRK6 (en concreto, una forma truncada que carece de su dominio amino terminal) como una proteína de unión a DREAM. Estudios posteriores mostraron que tanto GRK2 como GRK6 interaccionan con DREAM, de forma dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y de los dominios LCD (dominios ricos en leucina) 1 y 2 de DREAM (Ruiz-Gómez, 2007).

En base a estos resultados surgió una colaboración entre nuestro grupo y el del Dr. Naranjo que llevó a la identificación de DREAM como nuevo sustrato de GRKs.

### 1.1.- DREAM es sustrato de GRK2 y GRK6.

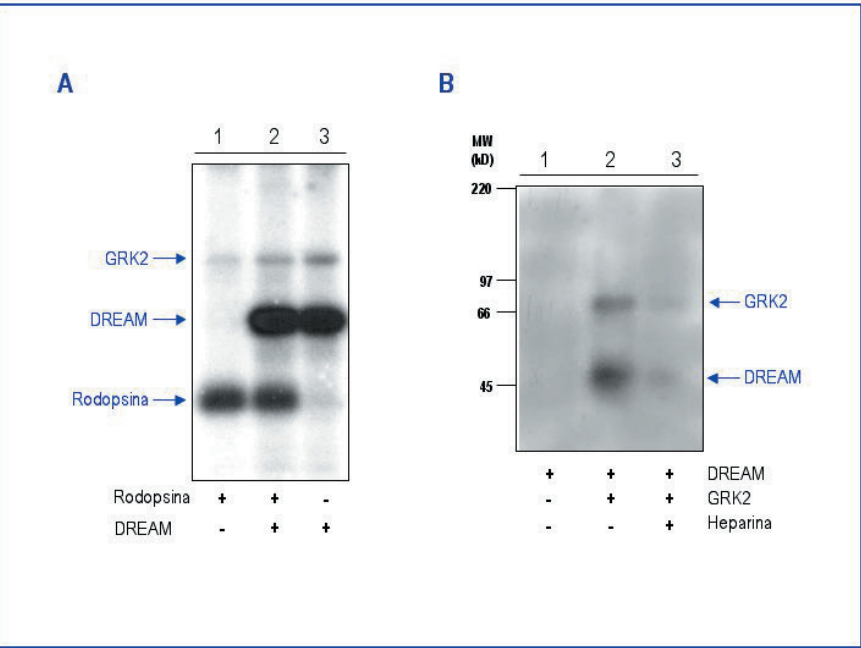
Las proteínas neuronales sensoras de calcio son capaces de modular la actividad de distintos miembros de la familia de GRKs (rev. en Salles, 2000). Como ya hemos mencionado en la introducción, recoverina y análogos interaccionan e inhiben GRK1, calmodulina inhibe diferencialmente GRK2-6 y GRK2 interacciona con NCS-1 (Pronin, 1997; Kabbani, 2002).

En este contexto, nos preguntamos si DREAM, que interaccionaba tanto con GRK2 como con GRK6, podría estar actuando como regulador de la actividad de distintos miembros de la familia de GRKs. Para abordar este estudio, analizamos el efecto de DREAM en la actividad de las GRKs sobre rodopsina, un receptor usado rutinariamente como sustrato para estudiar la funcionalidad de estas quinasas (Zhao, 1995).

Como se observa en la **figura R 1A**, la presencia de la proteína GST-DREAM no ejerce ningún efecto en la fosforilación de rodopsina por GRK2 y, sin embargo, se observa la aparición de una banda fosforilada correspondiente al tamaño de DREAM, lo que nos sugirió que esta proteína podía ser sustrato de la quinasa. Así, estudios de fosforilación “in vitro”, realizados utilizando GRK2 recombinante y la proteína de fusión GST-DREAM purificada, nos mostraron que la fosforilación de DREAM por GRK2 también tiene lugar en ausencia de rodopsina (**figura R 1A y 1B**) y que la heparina, inhibidor de GRK (Benovic, 1989), disminuye drásticamente esta fosforilación. Estos resultados nos estaban indicando que GRK2 y DREAM no sólo interaccionan sino que, además, DREAM es sustrato de la actividad quinasa de GRK2.

Dado que los resultados obtenidos por el grupo del Dr. Naranjo indicaban que GRK6 también interacciona con DREAM, procedimos a la caracterización de la fosforilación “in vitro” de DREAM por esta quinasa.

RESULTADOS



**FIGURA R 1.- GRK2 FOSFORILA DREAM.**

A) Posible efecto de DREAM en la actividad de GRK2 sobre rodopsina. Las combinaciones indicadas de la proteína de fusión GST-DREAM (100 nM) purificada y preparaciones de rodopsina (100 nM) se incubaron con GRK2 recombinante (50 nM) en tampón de fosforilación durante 30 minutos a 30°C, en presencia de una fuente de luz, como se detalla en el apartado 13.1 de MyM. La reacción se detuvo por adición de tampón de carga de electroforesis. Las muestras se resolvieron en geles de SDS-poliacrilamida al 10%. La figura representa la autorradiografía de un gel representativo de 3 ensayos, indicándose con una flecha las bandas correspondientes a la migración de las

proteínas GRK2, rodopsina y DREAM fosforiladas.

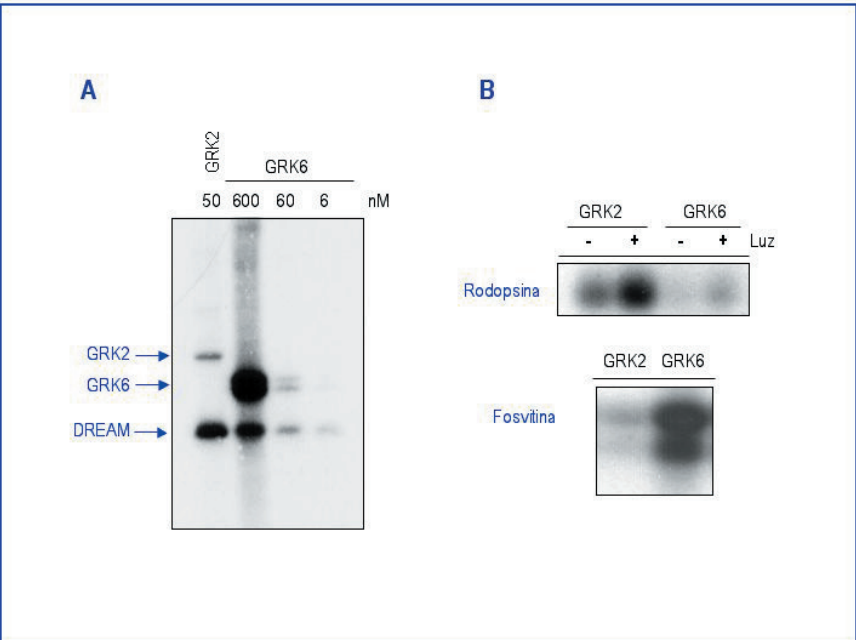
B) Caracterización de la fosforilación de DREAM por GRK2. La proteína de fusión GST-DREAM (25 nM) purificada fue incubada con o sin GRK2 recombinante (25 nM) durante 30 minutos, en presencia o ausencia de 0,8  $\mu$ M heparina.

Los estudios realizados utilizando GRK2 y GRK6 recombinantes nos mostraron que, al contrario de lo que ocurre con GRK2, no se observa una fosforilación aparente de DREAM a bajas concentraciones de GRK6 (**figura R 2A**), siendo necesario aumentar su concentración hasta 600 nM para alcanzar los niveles de fosforilación obtenidos con GRK2. Por tanto, aunque DREAM es también fosforilada por GRK6, es necesario una concentración de la quinasa 10 veces mayor para lograr niveles de fosforilación de DREAM análogos a la obtenidos con GRK2.

**FIGURA R 2.- DREAM SE FOSFORILA MENOS EFICIENTEMENTE POR GRK6.**

A) Fosforilación de DREAM por distintas concentraciones de GRK6. GST-DREAM (100 nM) se incubó con las concentraciones de GRK6 recombinante indicadas en la figura, en tampón de fosforilación durante 30 min. a 30°C (como se detalla en el apartado 13.1 de MyM). Como control se incluyó la fosforilación de GST-DREAM por GRK2 recombinante (50 nM). Se muestra una autorradiografía de un gel representativo de 3 ensayos. La migración de GRK2, GRK6 y DREAM se muestra con una flecha.

B) Fosforilación de rodopsina, un sustrato receptor de membrana, y fosvitina, un sustrato citosólico, por preparacio-

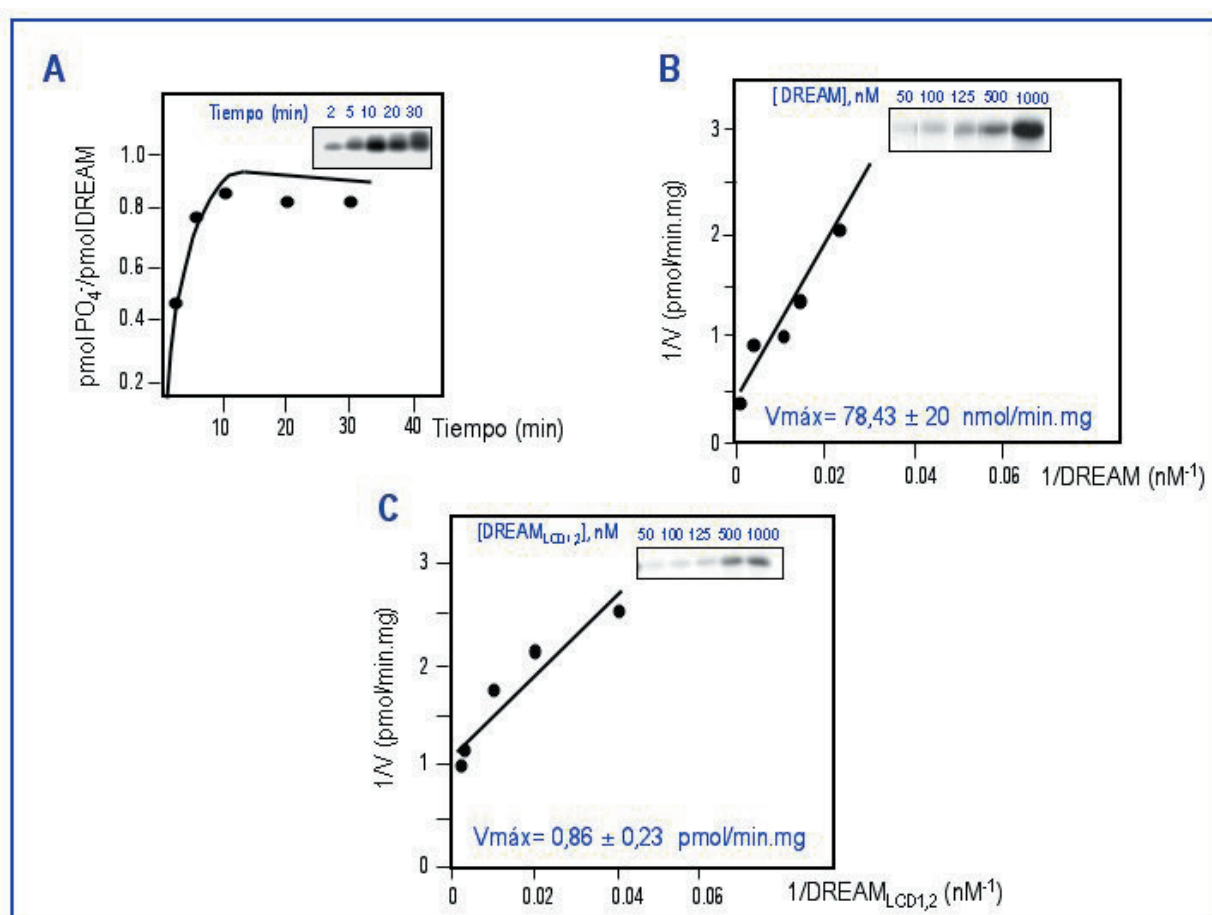


nes recombinantes de GRK2 y GRK6. GRK2 recombinante (25 nM) o GRK6 (25 nM) se utilizaron para fosforilar rodopsina (1  $\mu$ M), tanto en presencia como en ausencia de luz, y fosvitina (10  $\mu$ g) durante 30 minutos a 30°C. Las muestras se procesaron como en R 1.

Aunque los niveles de autofosforilación de GRK6 parecían indicar que la quinasa era activa, para descartar que ese efecto fuera debido a una falta de actividad intrínseca de GRK6, decidimos utilizar sustratos alternativos (rodopsina y fosvitina, buenos sustratos de GRK2 y GRK6, respectivamente) (Benovic, 1986; Loudon, 1994) para determinar la actividad de las quinasas recombinantes. Como cabía esperar, GRK6 es peor quinasa frente a rodopsina pero fosforila muy eficientemente fosvitina (**figura R 2B**). Por tanto, podemos concluir que DREAM es mejor sustrato “in vitro” de GRK2 que de GRK6, bajo nuestras condiciones experimentales.

## 1.2.- Caracterización de la fosforilación de DREAM por GRK2.

Puesto que GRK2 fosforila DREAM más eficientemente que GRK6, nos centramos en la caracterización de la fosforilación por esta quinasa. Para ello se utilizó la proteína de fusión His-DREAM ya que, según datos previos, DREAM unida a His es mejor sustrato para la quinasa que la forma unida a GST.



**FIGURA R 3.- CINÉTICA DE LA FOSFORILACIÓN DE DREAM POR GRK2.**

A) *Curso temporal de la fosforilación de His-DREAM por GRK2.* La proteína His6-DREAM (50 nM) se incubó con GRK2 recombinante (25 nM) en tampón de fosforilación a 30°C, parándose la reacción por adición de tampón de carga de electroforesis a los tiempos indicados. Las muestras se resolvieron en un gel de SDS-poliacrilamida del 12%, identificándose las fosfoproteínas por autorradiografía. Las bandas correspondientes a DREAM se cortaron del gel y se analizó la radioactividad incorporada por Cerenkov (Mathews, 1968), para determinar la estequiometría de la fosforilación (como se detalla en el apartado 13.1 de MyM). La figura muestra una autorradiografía representativa de 3 ensayos realizados.

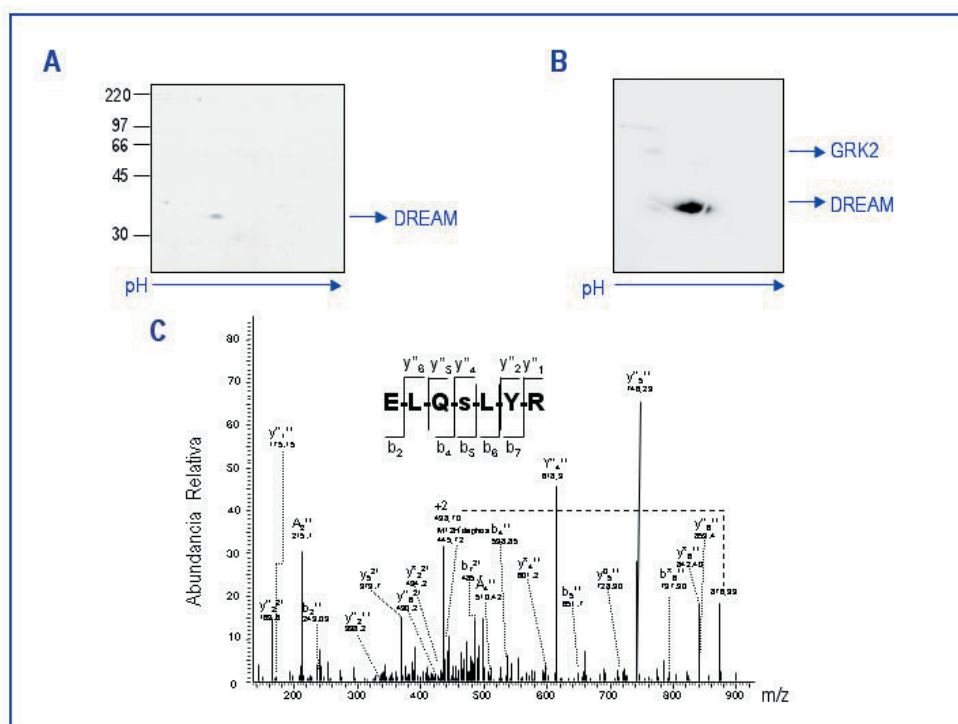
B y C) *Análisis de saturación de la fosforilación de DREAM por GRK2.* Como se indica en la figura, distintas concentraciones de las proteínas recombinantes GST-DREAM (B) y GST-DREAMLCD1,2 (C) se incubaron durante 15 min con GRK2 (25 nM). Las muestras se procesaron y analizaron como en A. Los datos son la media de, al menos, tres experimentos independientes.

## RESULTADOS

En primer lugar, analizamos la cinética del proceso de fosforilación utilizando His-DREAM (50 nM) y GRK2 recombinante (25 nM) a distintos tiempos. La **figura R 3A** muestra que la fosforilación de His-DREAM por GRK2 tiene lugar rápidamente ( $t_{1/2} = 5$  min.) con una estequiometría de  $\approx 0,8$  pmol Pi incorporado/pmol de DREAM, cuando ambas proteínas están presentes a las concentraciones indicadas.

Por otro lado, los análisis de saturación (**figura R 3B**) realizados a los 15 min. con distintas concentraciones de His-DREAM y 25nM de GRK2 recombinante revelaron una constante de Michaelis ( $K_m$ ) para la reacción de fosforilación de  $4,6 \pm 0,11$  nM y una velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) de  $78,43 \pm 20$  nmol Pi/min.mg de proteína. La afinidad que GRK2 presenta por DREAM es mayor que la que se ha descrito para otros sustratos de esta quinasa (Freeman, 2002; Pronin, 2000; Ruiz-Gómez, 2000), lo que indica que DREAM es un buen sustrato de GRK2.

Los estudios de interacción realizados en el laboratorio de J. R. Naranjo habían mostrado que DREAM interaccionaba con GRK2 de manera dependiente de sus dominios LCD. Si realizamos el ensayo de saturación de la fosforilación utilizando un doble mutante de los sitios LCD (dominios ricos en residuos de Leucina) de DREAM ( $\text{GST-DREAM}_{\text{LCD1,2}}$ ), se pone de manifiesto (**figura R 3C**) que, aunque sigue produciéndose la fosforilación del doble mutante de DREAM, la eficiencia disminuye considerablemente ( $V_{m\acute{a}x} = 0,86$  nmol de Pi/min mg de proteína). Por tanto, la interacción entre DREAM y GRK2 está afectando a la capacidad de la quinasa para llevar a cabo dicha fosforilación.



**FIGURA R 4.- IDENTIFICACIÓN DEL SITIO PREFERENTE DE FOSFORILACIÓN DE DREAM POR GRK2.**

1,5 mg de la proteína recombinante DREAMHis6 purificada se incubaron con 0,9 mg de GRK2 en tampón de fosforilación durante 2-3 horas a 30°C. Las muestras se concentraron por precipitación con acetona (Ruiz-Gómez, 2000) y se sometieron a electroforesis bidimensionales (apartado 11.1.2 de MyM). La primera dimensión (CIEF) del gel se realizó en IPGs de amplio rango no lineal de pH (pH3-10 NL/18 cm, Amersham Bioscience GE: Healthcare) en un aparato de electroforesis horizontal (Ettan IPGphor, Amersham Bioscience) según el método descrito por Görg (Görg, 1999). Las IPG se rehidrataron en solución de muestras (rehidratación en gel) como se detalla en 11.1.2 de MyM. La segunda dimensión se realizó en un gel SDS-poliacrilamida del 12%. A) Tinción del gel. Se realizó en Azul Brillante de Coomassie R-250 al 0.1% en etanol al 40%, ácido acético al 10% durante 3h, siendo desteñidas en etanol al 30%, ácido-acético al 10%. B) Las fosfoproteínas se detectan por autorradiografía. C) Espectro de fragmentación del péptido m/z 430.7. En la figura se indica el precursor iónico con carga +2 correspondiente a la pérdida de los 98 Da del grupo  $\text{H}_2\text{PO}_4$ . Se muestra la secuencia peptídica y el espectro de la fragmentación obtenida con la nomenclatura de Roepstorff y Fohlman (1984) (ver apartado 14 de MyM).

1.3.- Identificación del sitio de fosforilación de DREAM por GRK2.

Para poder establecer la repercusión funcional que la fosforilación de DREAM por GKR2 podía tener en la actividad de esta proteína sensora de calcio, intentamos identificar el/ los sitios de fosforilación de DREAM por la quinasa, para así generar los mutantes de fosforilación correspondientes.

De acuerdo con los datos estequiométricos, el análisis de DREAM fosforilado por GRK2 por electroforesis bidimensional sugirió que la mayoría de las proteínas incorporaban un único fosfato en presencia de la quinasa, pues se observaba la aparición de dos bandas/puntos en la tinción del gel resultante de la electroforesis bidimensional (figura R 4A) y uno en la autorradiografía del mismo (figura R 4B).

Para identificar el sitio preferente de fosforilación, 1,5 mg de la proteína recombinante His-DREAM se incubaron con 0,9 mg de GRK2 recombinante, en presencia o ausencia de 100  $\mu$ MATP. El análisis de espectrometría de masas por trampa iónica (como se detalla en apartado 14 de MyM), realizado en colaboración con el servicio de proteómica de la Red Cardiovascular del Instituto de Salud Carlos III (RECAVA) del que forma parte nuestro grupo de investigación, identificó un péptido fosfo-tríptico, ELQSLYR, que contenía un residuo de serina modificado por fosforilación en la posición 95 (figura R 4C y 5A), no observable en el control realizado en ausencia de ATP.

A continuación, se generaron, por mutagénesis dirigida, los mutantes que mimetizan la forma no fosforilable (S95A) y la forma constitutivamente fosforilada (S95D) de DREAM. En la figura R 5B se observa como la mutación de la serina 95 de DREAM a alanina o a aspártico reduce considerablemente su fosforilación con las distintas concentraciones de DREAM utilizadas, para una misma cantidad de la quinasa (figura R 5C). Estos datos confirmaban los resultados obtenidos mediante las técnicas de secuenciación de proteínas, señalando a la Ser95 como el sitio preferente de fosforilación de la proteína DREAM por GRK2.

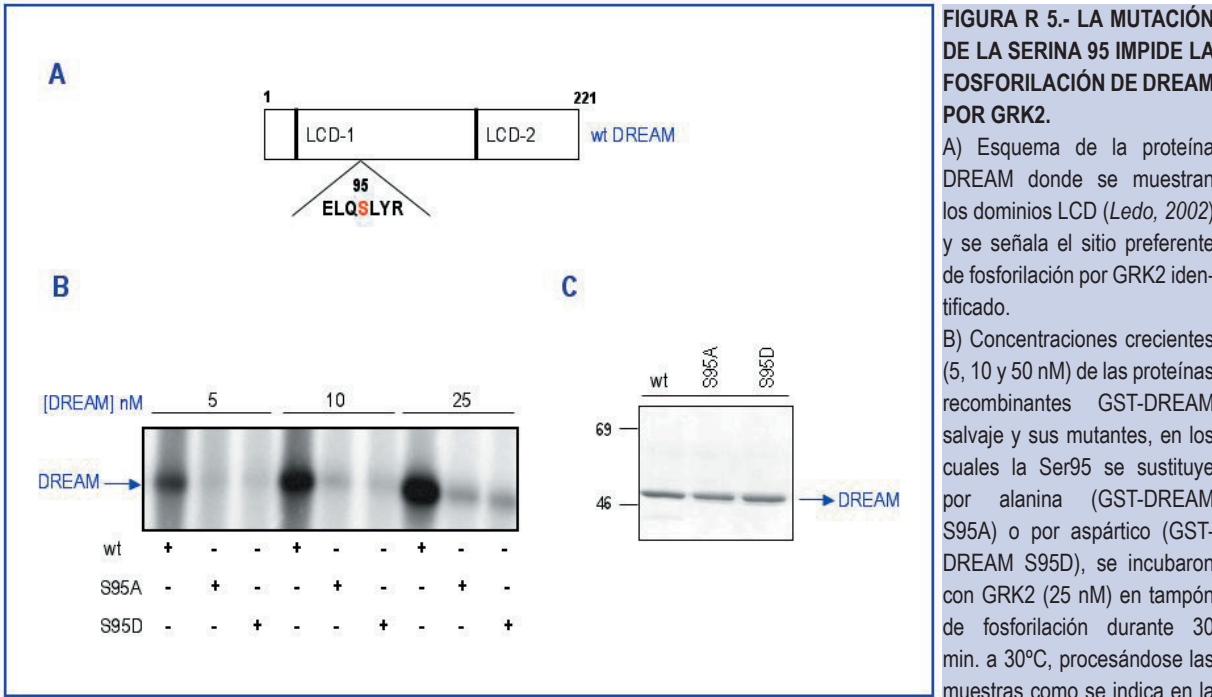


FIGURA R 5.- LA MUTACIÓN DE LA SERINA 95 IMPIDE LA FOSFORILACIÓN DE DREAM POR GRK2.

A) Esquema de la proteína DREAM donde se muestran los dominios LCD (Ledo, 2002) y se señala el sitio preferente de fosforilación por GRK2 identificado.

B) Concentraciones crecientes (5, 10 y 50 nM) de las proteínas recombinantes GST-DREAM salvaje y sus mutantes, en los cuales la Ser95 se sustituye por alanina (GST-DREAM S95A) o por aspártico (GST-DREAM S95D), se incubaron con GRK2 (25 nM) en tampón de fosforilación durante 30 min. a 30°C, procesándose las muestras como se indica en la

figura R 1. Se presenta una autorradiografía representativa de, al menos, tres ensayos realizados.

C) Tinción por Azul brillante de Coomassie del gel de SDS-poliacrilamida al 12% de las proteínas de fusión a GST de DREAM salvaje y mutantes utilizadas en el apartado B.

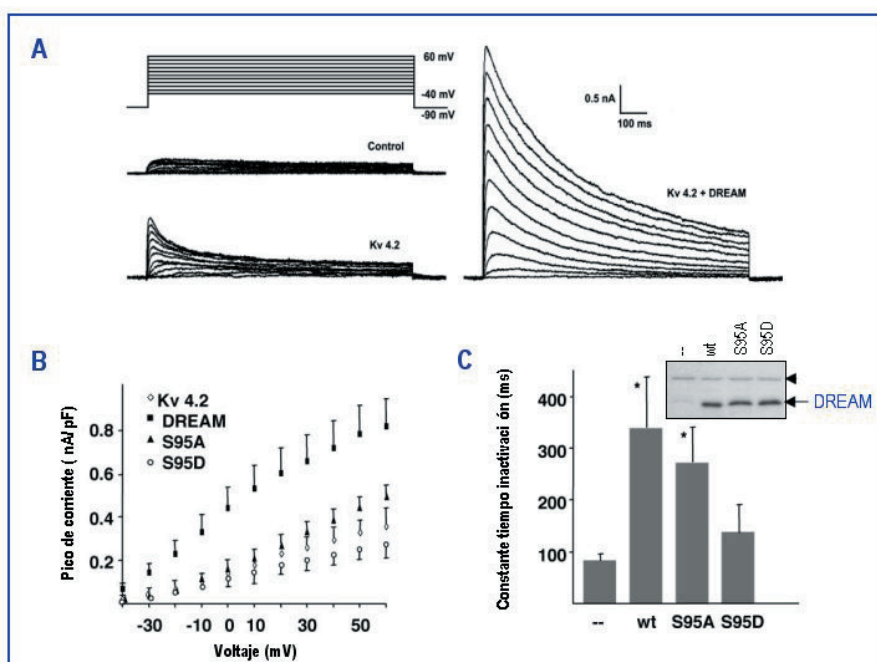


## RESULTADOS

### 1.4.- La fosforilación de DREAM por GRK2 no afecta a su actividad como represor transcripcional pero sí regula la función de los canales de potasio Kv4.

Como hemos mencionado anteriormente, la proteína DREAM recibe también el nombre de calsenilina o KChIP3. DREAM es una proteína multifuncional con funciones específicas en distintos compartimientos celulares: (i) En el núcleo, actúa como represor transcripcional dependiente de calcio (*Carrion, 1999*); (ii) en la membrana plasmática, interacciona con canales de potasio dependiente de voltaje tipo A (denominándose KChIP3, potassium-channel interacting-protein 3) (*An, 2000*), y (iii) en el retículo, interacciona con presenilinas (*Buxbaum, 1998*), de forma dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$ , con papel importante en la apoptosis celular y el metabolismo del péptido  $\beta$ -amiloide.

En este contexto, en colaboración con los grupos del Dr. José Ramón Naranjo (CNB) y del Dr. Valentín Ceña (Universidad de Castilla La Mancha) se analizó la capacidad de los mutantes DREAM S95A y S95D para actuar como represores transcripcionales dependientes de calcio (trabajo realizado en el laboratorio de J. R. Naranjo) y como moduladores de los canales de potasio dependientes de voltaje de tipo A (trabajo realizado en el laboratorio de V. Ceña). De los resultados puede deducirse que mientras que los mutantes de DREAM no afectan a su papel como modulador de DRE, sí alteran las propiedades de los canales de potasio de tipo A Kv4.2.



**FIGURA 6.- LOS MUTANTES DE DREAM EN LA SERINA 95 MODIFICAN LAS PROPIEDADES DE LOS CANALES Kv4.2.**

En los ensayos de electrofisiología, las células HEK-293 se sembraron en cubres de 20 mm, dos días antes de la transfección, a una confluencia del 50%. Previo a la transfección, las células se lavaron con DMEM sin suero. Las células se transfectaron con Lipofectamina 2000 (Invitrogen), en condiciones libres de suero, con 2  $\mu\text{g}$  de Kv4.2 (o el DNA de interés) y 1  $\mu\text{g}$  de EGFP-DREAM o EGFP, como control. El ensayo electrofisiológico se realizó 35 horas después de la transfección.

A) Protocolo de pulso de voltaje y corriente de potasio superficial en células HEK-293 no transfectadas y

transfectadas con Kv4.2 en ausencia (Kv4.2) o presencia de DREAM (Kv4.2 + DREAM).

B) Curva de densidad de corriente frente a voltaje de células HEK-293 transfectadas transitoriamente con el canal Kv4.2 solo (Kv4.2) o junto con DREAM salvaje (DREAM), DREAM-S95A (S95A) o DREAM-S95D (S95D). pF, picofaradios.

C) Constante de tiempo de inactivación de la corriente, medida a + 50 mV de potencial de pipeta, para células HEK-293 transfectadas transitoriamente con Kv4.2 sólo (--) o junto con DREAM salvaje (wt), DREAM-S95A (S95A) o DREAM-S95D (S95D). Los datos representan la media  $\pm$  ES de 6-9 células, \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ . La cantidad de proteína presente en las muestras utilizadas en el ensayo se detectó con el anticuerpo policlonal de DREAM (Ab1014, *Link, 2004*) mediante ensayos de inmunodetección. Se señala con una flecha la expresión de DREAM y sus mutantes, y la punta de flecha marca una banda inespecífica utilizada como control de carga.

En los últimos años se había descrito que DREAM regula las propiedades, el tráfico a la membrana y la tetramerización de los canales de potasio Kv4.2 (*Kunjilwar, 2004*) y, al igual que otros miembros de la familia de proteínas KChIP, necesita estar palmitoilado en sus cisteínas 45 y 46 para mediar el tráfico de los canales a la



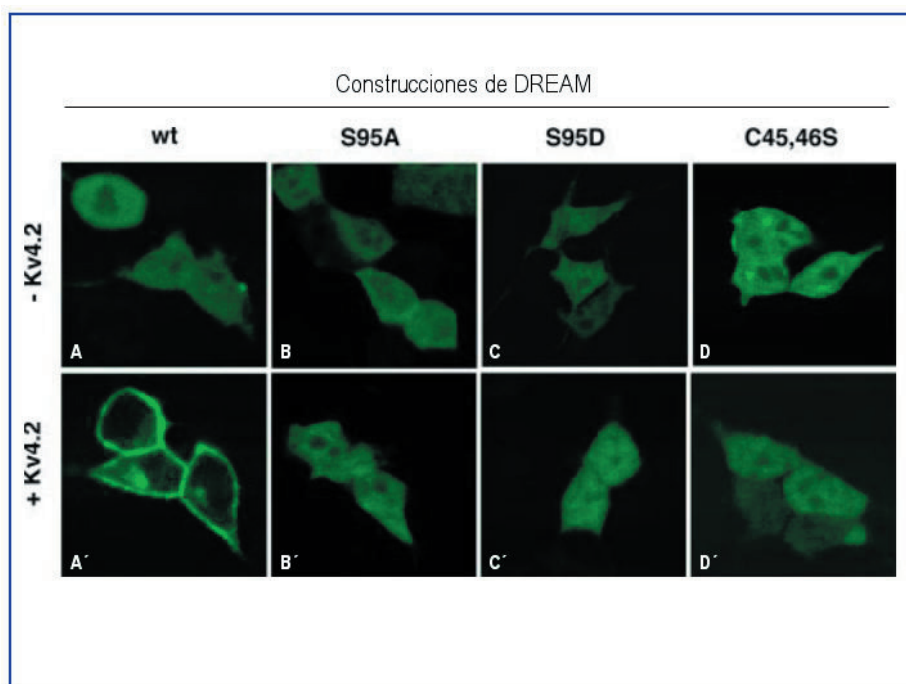
membrana e interaccionar con  $\text{Ca}^{2+}$  para modular la actividad de los mismos (Takimoto, 2002). Por tanto, se estudió el posible efecto de la fosforilación de DREAM por GRK2 en este proceso.

El grupo de Valentín Ceña realizó una serie de transfecciones transitorias en células HEK-293 para medir la corriente de potasio en la célula entera, tras un pulso de voltaje, por la técnica Patch. La cotransfección de DREAM salvaje y las subunidades Kv4.2 del canal conlleva un aumento en el pico de densidad de corriente de  $0,25 \pm 0,05$  a  $0,75 \pm 0,1$  nA/ picrofaradios ( $n = 9$ ) y una ralentización de la constante del tiempo de inactivación de  $92,2 \pm 12$  a  $340,4 \pm 97,8$  ms a 50 mV de potencial de pipeta (figura R 6B y 6C), de acuerdo con datos publicados anteriormente (An, 2000). La co-expresión de los canales Kv4.2 con DREAM S95A provocó un aumento significativo del pico de densidad de corriente a  $0,43 \pm 0,05$  nA/ picrofaradios ( $n = 6$ ) y de la constante del tiempo de inactivación,  $273,9 \pm 66,5$  ms ( $n = 9$ ), en comparación con el canal solo (figura R 6B y 6C). Los datos resultaron ser aún más interesantes cuando se transfectaron los canales de potasio Kv4.2 junto con el mutante que mimetiza la forma constitutivamente fosforilada DREAM S95D. En este caso se produjo un descenso del 50 % en el pico de densidad de corriente,  $0,31 \pm 0,07$  nA/ picrofaradios ( $n = 6$ ) respecto al obtenido sólo con el canal, mientras que la constante del tiempo de inactivación prácticamente no sufrió cambios ( $140 \pm 54,8$  ms) (figura R 6B y 6C).

De todos estos datos se puede concluir que la fosforilación en la Ser95 de DREAM por GRK2 conduce a la pérdida de su capacidad de modular las propiedades de los canales Kv4.

### 1.5.- La fosforilación de DREAM por GRK2 regula el tráfico de los canales Kv4 a la membrana plasmática.

Se ha descrito que la co-expresión de las proteínas KChIPs 1-3 causan una redistribución dramática de Kv4.2, liberando la retención en el retículo endoplásmico y permitiendo el tráfico a la superficie celular (Shibata, 2003). La región N-terminal de Kv4.2. contiene el dominio de unión a KChIP y la señal para la retención en el retículo. La asociación de KChIP al canal enmascara la señal de retención y permitir su tráfico fuera del retículo (Shibata, 2003; Ma, 2002).



**FIGURA R 7.- LA FOSFORILACIÓN DE DREAM EN LA SERINA 95 AFECTA A SU LOCALIZACIÓN SUBCELULAR.**

Células HEK-293 se sembraron sobre cristales de 35mm, pre-tratados con poli-lisina (SIGMA) ( $10 \mu\text{g/ml}$ ), y se transfectaron con el método de precipitación con fosfato de calcio con 10 ng de EGFP-DREAM, salvaje (A) y mutantes (B, C y D), en presencia o ausencia de 300 ng de Kv4.2. 48 horas después de la transfección, las células se fijaron con paraformaldehído 4%. La presencia de la proteína EGFP se detectó mediante microscopia confocal.

## RESULTADOS

Con objeto de estudiar si la reducción en la conductancia neta observada tras la co-transfección del mutante DREAM S95D podía estar relacionada con una reducción en la expresión del canal en la membrana plasmática se analizó la localización de EGFP-DREAM en presencia o ausencia de Kv4.2.

Estudios de microscopía confocal de células HEK-293 transfectadas con EGFP-DREAM, o sus mutantes de fosforilación y palmitoilación, muestran una distribución uniforme de DREAM en toda la célula, cuando la proteína se expresa de forma aislada (**figura R 7A**). La co-expresión de EGFP-DREAM y los canales Kv4.2 (**figura R 7A'**) conduce a la translocación de DREAM a la membrana donde co-localiza con los canales (An, 2000). Por el contrario, cuando los canales se co-transfectan con el mutante de DREAM que mimetiza el estado fosforilado de la proteína (DREAM-S95D) (**figura R 7C'**) no se observa localización de la proteína DREAM en la membrana. La no localización de Kv4 en la membrana en presencia de DREAM-S95D podría dar cuenta de la falta de actividad del canal de potasio promovida por el mutante. En definitiva, la fosforilación de la Ser95 de DREAM por GRK2 parece prevenir la localización de Kv4.2 en la membrana. Sorprendentemente, la co-transfección con el mutante no fosforilable EGFP-DREAM S95A (**figura R 7B'**) o con el control negativo EGFP-DREAM C45S, C46S (**figura R 7D'**) no conlleva tampoco un aumento de la señal fluorescente en la membrana, a pesar de que estos mutantes promueven una activación de corriente mayor que el canal expresado de forma aislada. Esto puede ser debido a la diferente sensibilidad de las técnicas utilizadas. El número de moléculas de estos mutantes presentes en la membrana plasmática será demasiado bajo para su detección por microscopía confocal, pero suficiente para promover la activación de corriente.

### 1.6.- Calcineurina regula el tráfico de Kv4 mediado por DREAM.

Según los resultados obtenidos hasta el momento, DREAM provoca un aumento de corriente en los canales Kv4, que se ve reducido hasta en un 50 % cuando lo que se co-transfecta con el canal es el mutante que mimetiza la forma fosforilada de DREAM (DREAM-S95D). Por otro lado, hemos visto que la fosforilación de DREAM en la Ser95 previene la localización de Kv4 en la membrana plasmática. Estos datos estaban apuntando a la necesidad de la desfosforilación de DREAM para que la proteína recupere su capacidad como modulador de canales Kv4 y se transloque correctamente a la membrana. Estos resultados, unidos a que la actividad de DREAM sobre los canales y la interacción con GRK2 son dependientes de calcio, nos llevaron a analizar el posible papel de calcineurina (una Ser/Thr fosfatasa estimulada por  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina) (Klee, 1991) en el ciclo de fosforilación / desfosforilación de DREAM.

Como se refleja en la **figura R 8A**, el tratamiento de las células transfectadas con inhibidores de calcineurina, FK506 (10  $\mu\text{M}$ ) y ciclosporina A (1  $\mu\text{M}$ ), bloquea el incremento de corriente inducido por la presencia de DREAM, sin alterar la densidad de corriente del canal cuando éste se expresa de forma aislada. La falta de activación del canal no se debe a un defecto en la capacidad de DREAM para promover la tetramerización de Kv4, como se muestra en la **figura R 8B**, pues se puede observar como, incluso en presencia de inhibidores de calcineurina, DREAM induce la tetramerización del canal (DREAM + Inhibidores).

Por otro lado, los estudios de microscopía confocal en células HEK-293 transfectadas transitoriamente con EGFP-DREAM, en presencia o ausencia de Kv4.2, muestran que la presencia de inhibidores de calcineurina provoca una localización menor y más irregular de EGFP-DREAM en la membrana, a pesar de la presencia de los canales Kv4.2 (**figura R 8C**). Por tanto, los resultados sugieren que, efectivamente, la desfosforilación es necesaria para aumentar la corriente y la localización en la membrana plasmática de los canales Kv4 promovida por DREAM.

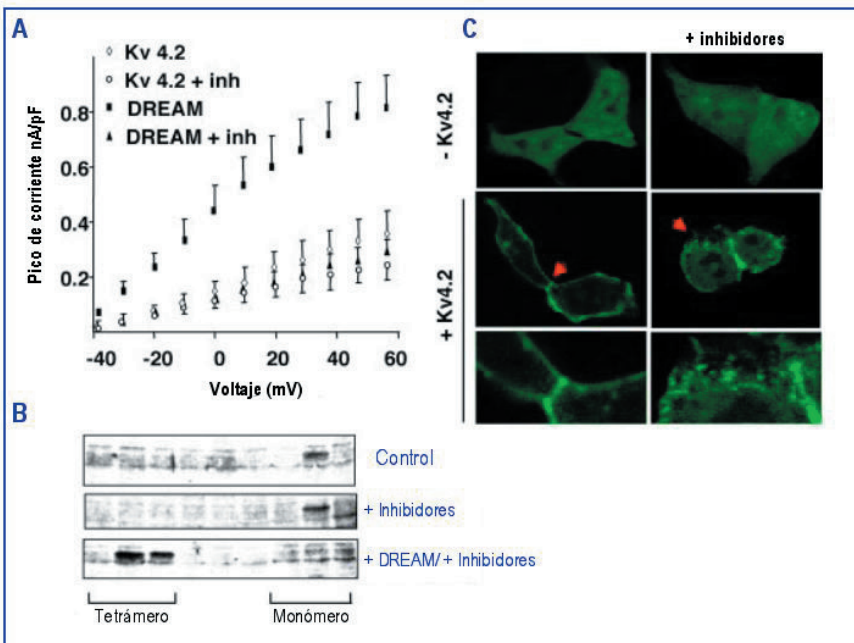
**FIGURA R 8.- LA INHIBICIÓN DE CALCINEURINA BLOQUEA LA EXPRESIÓN DE CORRIENTE Y LA LOCALIZACIÓN DE MEMBRANA DE LOS CANALES Kv4.2.**

A) Representación gráfica de la densidad de corriente frente a voltaje. Células HEK-293 transfectadas transitoriamente, como se detalla en la **figura R 6**, con Kv4 sólo o junto con DREAM salvaje, en ausencia o presencia de los inhibidores de calcineurina FK506 (10  $\mu$ M) y ciclosporina A (1  $\mu$ M). pF, picrofaradios.

B) Cromatografía de exclusión por tamaño: Se muestra el tamaño del canal mutante de tetramerización Kv4.2(-ZnB3) sólo o tras ser co-transfectado con DREAM salvaje, en presencia o ausencia de los inhibidores de calcineurina.

Células CHO fueron transfectadas durante 24 horas, usando JetPei (PoliPlus-transfection, Illkirch, Francia), con 16  $\mu$ g de los plásmidos de DREAM y 4  $\mu$ g del canal mutante de tetramerización Kv4.2(-ZnB3) (Kunjilwar, 2004). Los extractos celulares (300  $\mu$ l) se aplicaron a una columna de Superose 6 (Amersham Bioscience), previamente en tampón Tris-HCl/ NaCl. Las fracciones de elución (400  $\mu$ l) se precipitaron con acetona en presencia del inhibidor de tripsina. Los precipitados proteicos se resuspendieron en SDS, se analizaron por electroforesis en geles SDS-poliacrilamida y se revelaron con un anticuerpo anti-Kv4.2 (N-15, Santa Cruz) para identificar la formación de monómeros y tetrámeros.

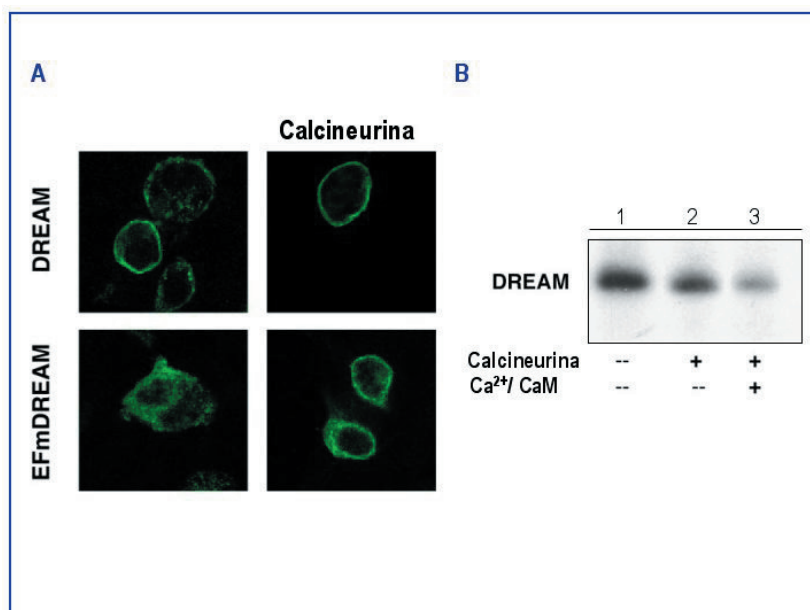
C) Microscopía confocal: Se muestra la localización subcelular de EGFP-DREAM en presencia de los canales Kv4.2, después de la inhibición de calcineurina, en células HEK-293 tras 48 horas de la transfección. Las punta de flecha rojas señalan la región que aparece ampliada en los paneles inferiores. Células HEK-293 se sembraron sobre cristales de 35mm, pre-tratados con poli-lisina (SIGMA) (10  $\mu$ g/ml). La transfección de las células se realizó utilizando el método de precipitación con fosfato de calcio con 10 ng de EGFP-DREAM, salvaje y mutantes y 300 ng de Kv4.2. Los inhibidores de fosfatasa, ciclosporina a (10  $\mu$ M) y FK506 (0.1  $\mu$ M), estuvieron presentes en el medio las últimas 6 horas. 48 horas después de la transfección, las células se fijaron con paraformaldehído 4% y se detectó la presencia de la proteína EGFP mediante un microscopio confocal.



Otros datos que apuntan al papel de la desfosforilación de DREAM en el correcto transporte de los canales a la membrana plasmática son los obtenidos con el mutante de DREAM insensible a  $Ca^{+2}$ , que presenta los dominios EF mutados (EFmDREAM). Como se observa en la **figura R 9A**, el estudio de la co-expresión del mutante EFmDREAM con Kv4 por microscopía confocal muestra una distribución intracelular difusa de DREAM, con poca presencia de la proteína en la membrana. Como hemos mencionado anteriormente, la interacción de DREAM y GRK2 es dependiente de calcio, por lo que los bajos niveles de Kv4 en la membrana pueden ser debidos a la incapacidad de DREAM de separarse de la quinasa, provocando una fosforilación permanente. Si esto es así, la desfosforilación del mutante por sobre-expresión de calcineurina debería revertir el efecto. Como se muestra en la **figura R 9A**, la co-transfección del mutante insensible a  $Ca^{+2}$  de DREAM (EFmDREAM) con calcineurina rescata la expresión en membrana del mutante de DREAM.

Estos datos se refuerzan al comprobar, por estudios de fosforilación "in vitro", que la calcineurina recombinante es capaz de desfosforilar eficazmente a DREAM fosforilado por GRK2 (**figura R 9B**).

Por tanto, el proceso de fosforilación-desfosforilación de DREAM mediado por GRK2 y calcineurina, respectivamente, podría estar regulando el tráfico de los canales Kv4 a la membrana.



**FIGURA R 9.- CALCINEURINA DESFOSFORILA DREAM Y REGULA SU LOCALIZACIÓN EN LA SUPERFICIE CELULAR.**

A) Localización subcelular de las proteínas EGFP-DREAM salvaje o el mutante de DREAM insensible a calcio (EFmDREAM). La transfección de las células HEK-293 se realizó como en la figura anterior con 10 ng de EGFP-DREAM, salvaje y mutantes, 10 ng de EFmDREAM, 300 ng de Kv4.2. y 3 µg de calcineurina. Tras fijar las células, la presencia de EGFP-DREAM se detectó directamente por microscopía confocal. El mutante EFmDREAM, unido al epítipo myc en lugar de a EGFP, se detectó incubando las células con el anticuerpo primario anti-Myc (9E10) y, posteriormente, con el anticuerpo secundario fluorescente anti-mouse Alexa 488 (Invitrogen). El experimento se repitió tres veces.

B) Desfosforilación "in vitro" por calcineurina de DREAM fosforilada por GRK2. Los ensayos de desfosforilación se iniciaron por adición de 25 µl de tampón de calcineurina 2X con 1,6 mM heparina en presencia o ausencia de 1,5 mM de Ca<sup>2+</sup> y 6,7 mg/ml de calmodulina más 10 unidades de calcineurina durante 1h a 30°C. Las muestras se procesaron como se detalla en el apartado 13.2 de MyM.

## 2.- LA FOSFORILACIÓN DE PRESENILINA 1 (PS1) POR GRK2 MODULA SU ESTABILIDAD Y SU ACTIVIDAD EN EL COMPLEJO $\gamma$ -SECRETASA.

### 2.1.- ¿Es la presenilina un modulador de la fosforilación de DREAM por GRK2?

Como hemos ido indicando a lo largo de esta memoria, DREAM fue identificada inicialmente como una proteína que se unía al extremo carboxilo terminal de PSs (PS1 y PS2) (Buxbaum, 1998) que, como parte del complejo presenilina/ $\gamma$ -secretasa, contribuyen a la apoptosis inducida por el péptido A $\beta$  y mediada por DREAM (Jo, 2003).

Por otro lado, hemos descrito en el capítulo anterior a DREAM como un nuevo sustrato de GRK2, identificando a la Ser95 como el sitio de fosforilación de DREAM por esta quinasa. Como se sabe que: (i) los últimos 103 aminoácidos del fragmento CTF de PS interactúan con DREAM (Buxbaum, 1998); (ii) el papel de la fosforilación de DREAM por GRK2 en la modulación del tráfico a la membrana de los canales de potasio tipo A Kv4.2. puede que tenga lugar en el ER; y (iii) tanto PSs como GRK2 se localizan en este compartimento (Annaert, 1999; Murga, 1996), nos pareció interesante estudiar el efecto que PS1 podría ejercer en la fosforilación de DREAM por GRK2.

Para determinar si la interacción entre DREAM y PS1 podía afectar a la fosforilación de DREAM comprobamos primero si en nuestras condiciones experimentales se reproducía la interacción entre PS1 y DREAM. Los ensayos de co-inmunoprecipitación se realizaron utilizando una línea celular que expresa establemente PS1 (células CHO-PS70, ver apartado 3.2 de MyM) transfectada transitoriamente con myc-DREAM. Como se muestra en la **figura R 10A**, ambas proteínas co-inmunoprecipitan en ausencia de estímulo, tal como se había descrito (Buxbaum, 1998).



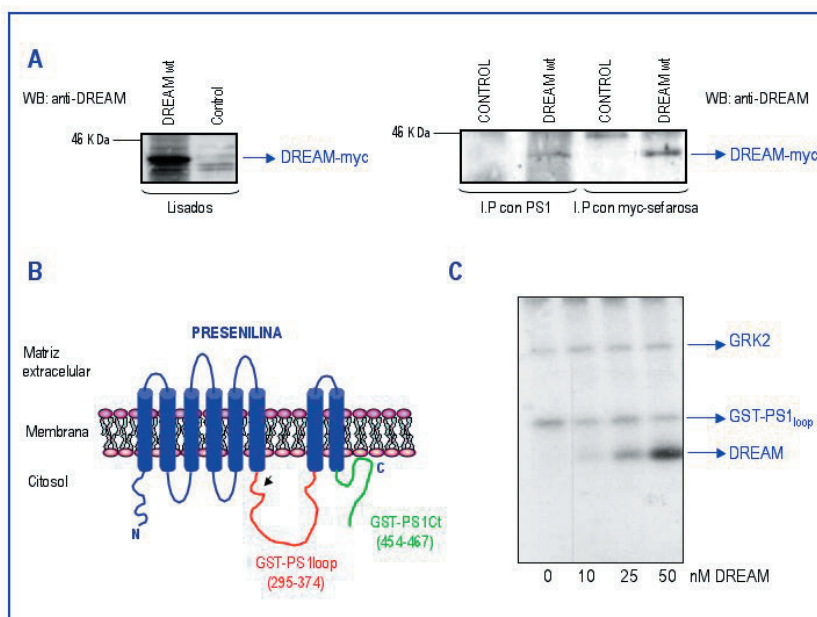
En las primeras aproximaciones realizadas para caracterizar el posible papel de PS1 como modulador de la fosforilación de DREAM por GRK2, se utilizaron las proteínas de fusión a GST de los dominios citoplasmático (GST-PS1<sub>loop</sub>, aminoácidos 295-374) y carboxilo terminal de PS1 (GST-PS1<sub>ct</sub>, aminoácidos (454-467) de ratón, proporcionadas por el laboratorio del Profesor Francisco Zafrá del CBMSO. Aunque estos dominios no se corresponden exactamente con la región de interacción con DREAM descrita para PS1 en la bibliografía (Buxbaum, 1998), nos pareció oportuno comenzar con estos fragmentos ya que, según los datos de topología propuestos en ese momento para PS1, eran los dominios supuestamente localizados hacia el citosol de la célula (**figura R 10B**). Los resultados obtenidos llamaron nuestra atención pues, como se muestra en la **figura R 10C**, el bucle citoplasmático de PS1 no afectaba a la fosforilación de DREAM por GRK2 y, sin embargo, PS1 parecía ser sustrato de la quinasa (**figura R 10C**), incluso cuando DREAM no estaba presente en la mezcla de fosforilación (**R 10C, carril 0**).

**FIGURA R 10.- PRESENLINA 1, PROTEÍNA QUE INTERACCIONA CON DREAM, ES TAMBIÉN SUSTRATO DE GRK2.**

A) PS1 y DREAM interactúan en células. Células CHO que expresan establemente PS1 (PS70) se transfectaron transitoriamente con pcDNA3.1 (control) o con pcDNA3.1-myc-DREAM (DREAMwt). 48 horas después de la transfección, las células se solubilizaron en tampón de solubilización NP40, como se detalla en el apartado 15.2 de MyM. Se tomaron alícuotas de estos solubilizados (10 %) para analizar los niveles de sobre-expresión (lisados) y el resto se dividió en dos, una mitad se utilizó para inmunoprecipitar con el anticuerpo anti-myc (Santa Cruz) y, la otra mitad, con anticuerpo anti-PS1 H-70 (Santa Cruz), durante toda la noche a 4°C como se describe en el apartado 15.2 de MyM. Los complejos inmunes (IP) se resolvieron en geles del 12% de SDS-poliacrilamida. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm (BioRad) (MyM, apartado 15.1). Posteriormente, las membranas se incubaron con una dilución 1:10000 del anticuerpo policlonal anti-DREAM (Ab1014) o una dilución 1:500 del anti-PS1 (H-70, Santa Cruz) y una dilución 1:50000 del anticuerpo secundario anti-conejo peroxidasa, revelándose con el sistema quimioluminiscente ECL (Amersham).

B) Diagrama de uno de los modelos de topología propuestos para la estructura de PS1. En él se muestran 8 dominios transmembrana (Doan, 1996). Entre los dominios transmembrana 6 y 7 se localiza el bucle citoplasmático. Tanto el extremo N-terminal, como el bucle, como el extremo C-terminal están orientados hacia el citosol. La punta de flecha indica el corte endoproteolítico que sufre PS1 para generar los fragmentos PS1-NTF y PS1-CTF (Thinakaran, 1996). En la figura, además, se indican las regiones de la proteína utilizadas para la construcción de las proteínas de fusión GST-PS1<sub>loop</sub> (295-374) (rojo) y GST-PS1<sub>ct</sub> (454-467) (verde).

C) Fosforilación de DREAM por GRK2 en presencia del bucle citoplasmático de PS1. Fosforilación de distintas concentraciones de GST-DREAM por GRK2 recombinante (25 nM) en presencia de la proteína de fusión GST-PS1<sub>loop</sub> (100 nM) en tampón de fosforilación durante 30 min. a 30°C, como se detalla en MyM, apartado 13.1. La reacción se detuvo por adición de tampón de carga de electroforesis. Las muestras se resolvieron en geles de SDS-poliacrilamida al 12%. En la figura se muestra una autorradiografía de un gel representativo de 3 ensayos, indicándose con flechas las bandas correspondientes a la migración de las proteínas GRK2, GST-PS1<sub>loop</sub> y DREAM.



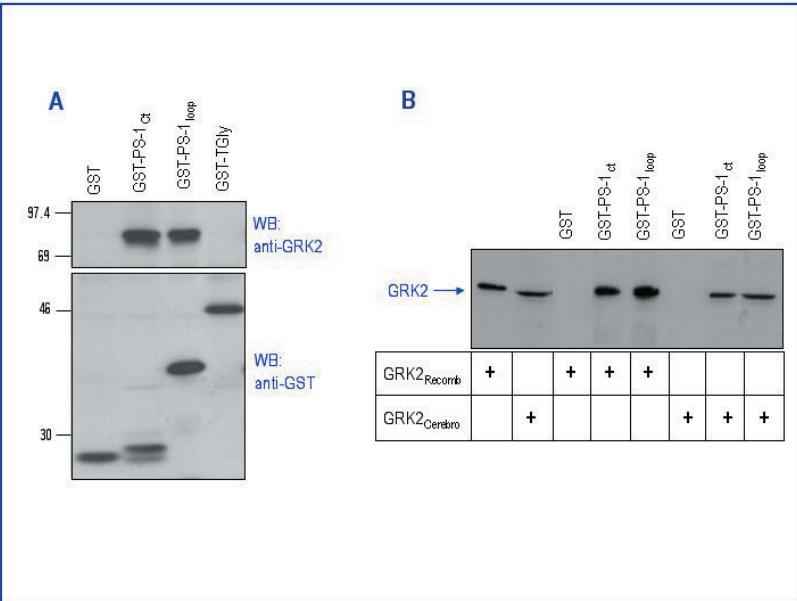
## 2.2.- Interacción “in vitro” e “in situ” entre PS1 y GRK2.

Como mencionamos en la introducción, a lo largo de los años se han identificado diversas proteínas capaces de interactuar con distintos dominios de PSs, incluyendo varias quinastas que interactúan y fosforilan a PS1 (GSK3β, PKC, PKA, Cdk5 o JNK), modulando su estabilidad, su degradación por caspasas o por el

## RESULTADOS

proteasoma, su localización subcelular o su actividad como complejo  $\gamma$ -secretasa frente a distintos sustratos (Kirschenbaum, 2001; Fluhrer, 2004; Lau, 2002; Kuo, 2008), etc. El dato de que el dominio bucle citoplasmático de PS1 es fosforilado por GRK2 nos llevó a caracterizar, en profundidad, la interacción entre estas proteínas, la fosforilación y el posible papel de esta modificación post-traduccional en la función de PS1 en la célula.

Se realizaron, en primer lugar, ensayos de interacción “in vitro” con preparaciones de proteínas purificadas. En estos ensayos las proteínas de fusión de los dominios bucle citoplasmático (GST-PS1<sub>loop</sub>) y carboxilo terminal (GST-PS1<sub>ct</sub>) de PS1 (ver esquema **figura R 10B**) se incubaron con GRK2 recombinante. Como controles se utilizaron la proteína GST y la proteína de fusión del transportador de la Glicina (GST-TGly) purificadas, disponibles en el laboratorio. En la **figura R 11A** se puede observar que la quinasa interacciona tanto con el bucle citoplasmático (GST-PS1<sub>loop</sub>) como con el dominio carboxilo terminal (GST-PS1<sub>ct</sub>) de PS1 y no así con las proteínas utilizadas como control. Estos datos nos están mostrando una interacción directa de GRK2 con ambos dominios de PS1 aunque, en este tipo de aproximación experimental, los niveles y concentraciones de las proteínas pueden diferir mucho de lo que ocurre en la célula. Con objeto de realizar el estudio en condiciones más próximas a la realidad, comprobamos que dicha interacción también tuviese lugar con GRK2 endógena presente en un extracto de cerebro. Como muestra la **figura R 11B**, ambas proteínas de fusión de PS1 son capaces de retener tanto GRK2 recombinante como GRK2 endógena presente en extracto de cerebro.



**FIGURA R 11.- INTERACCION “IN VITRO” DE PS1 Y GRK2.**

A) Interacción “in vitro” de dominios de PS1 y GRK2 recombinante. Los ensayos de interacción “in vitro” se realizaron incubando 100 nM de las proteínas de fusión indicadas (GST, GST-PS1<sub>loop</sub>, GST-PS1<sub>ct</sub> y GST-TGly), inmovilizadas en la resina, con GRK2 recombinante (50 nM), en un volumen final de 200  $\mu$ l durante 30 min. a 4°C. Tras procesar las muestras como se detalla en el apartado 16 de MyM, las muestras se separaron en un gel de SDS-poliacrilamida del 10%. En la figura se presenta el inmunomarcado tras electroforesis utilizando el anticuerpo policlonal PF2 (dil 1:500) (parte superior) o un anticuerpo monoclonal frente a GST (1:500) (parte inferior). Se muestra un gel representativo de 3 ensayos.

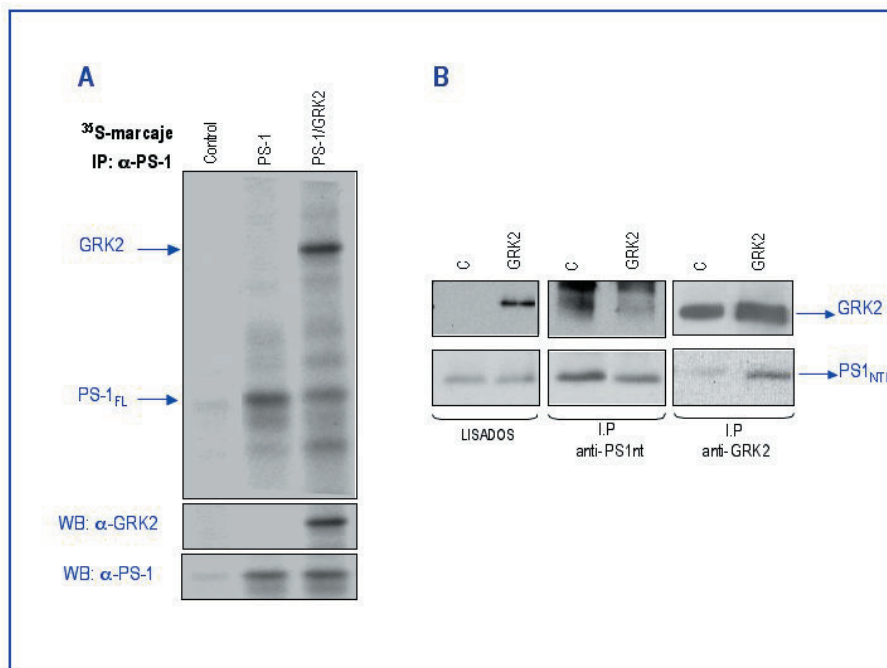
B) Asociación “in vitro” de dominios de PS1 y GRK2 de extracto de cerebro. 100 nM de proteínas de fusión GST, GST-PS1<sub>ct</sub> y GST-PS1<sub>loop</sub> se incubaron con 500 mg de extracto de cerebro o 50 nM de GRK2 recombinante en un volumen final de 200  $\mu$ l, procediendo como en el apartado A. Se muestra un gel representativo de 2 determinaciones realizadas independientemente.

Para confirmar si la interacción entre PS1 y GRK2 también tenía lugar “in situ” se realizaron dos tipos de aproximaciones, utilizando tanto sistemas de sobre-expresión como las proteína endógenas de la célula. En un primer abordaje, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación en células HEK-293 transfectadas transitoriamente con PS1 o con PS1 y GRK2. Debido a que la sobre-expresión de PS1 lleva a la falta de su correcto procesamiento (Brunkan, 2005) y a que los análisis de inmunodetección tras electroforesis eran difíciles de interpretar, por la co-migración de PS1 (su forma entera sin procesar) y GRK2 con las cadenas de inmunoglobulinas de los anticuerpos utilizados, analizamos la co-inmunoprecipitación tras el marcaje metabólico de las células con un mezcla de [<sup>35</sup>S]-Met-Cys. Como se muestra en la **figura R 12A** (parte superior), se observa la co-inmunoprecipitación de GRK2 y

PS1 en células transfectadas transitoriamente con ambas proteínas, al inmunoprecipitar con el anticuerpo frente a la región amino terminal de PS1 (anti-PS1<sub>Nt</sub>, H-70, Santa Cruz Biotechnology). De esto se deduce que la interacción entre presenilina y la quinasa también tiene lugar “in situ”.

#### FIGURA R 12.- INTERACCIÓN “IN SITU” DE PS1 Y GRK2.

A) Interacción “in situ” entre PS1 y GRK2 sobre-expresadas. 6x10<sup>6</sup> células HEK-293 transfectadas transitoriamente con PS1 o con PS1 y GRK2 se marcaron metabólicamente durante 2-3 horas, tal y como se describe en el apartado 12 de MyM. Las proteínas, marcadas con [<sup>35</sup>S]-Met-Cys, se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-PS1<sub>Nt</sub> (H-70 de Santa Cruz Biotech) y se resolvieron en geles de SDS-poliacrilamida, detectándose por fluorografía como se explica en el apartado 11.1.1 de MyM. Como control de expresión se utilizó un 10% de los solubilizados utilizados para la inmunoprecipitación, determinándose la cantidad de proteína mediante



inmunodetección tras electroforesis (apartado 15.1 de MyM) con los anticuerpos policlonales frente a GRK2 (anti-PF2, dil 1:500) y frente a PS1 (anti-PS1Nt H-70, dil. 1:500), como se detalla en la figura. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos.

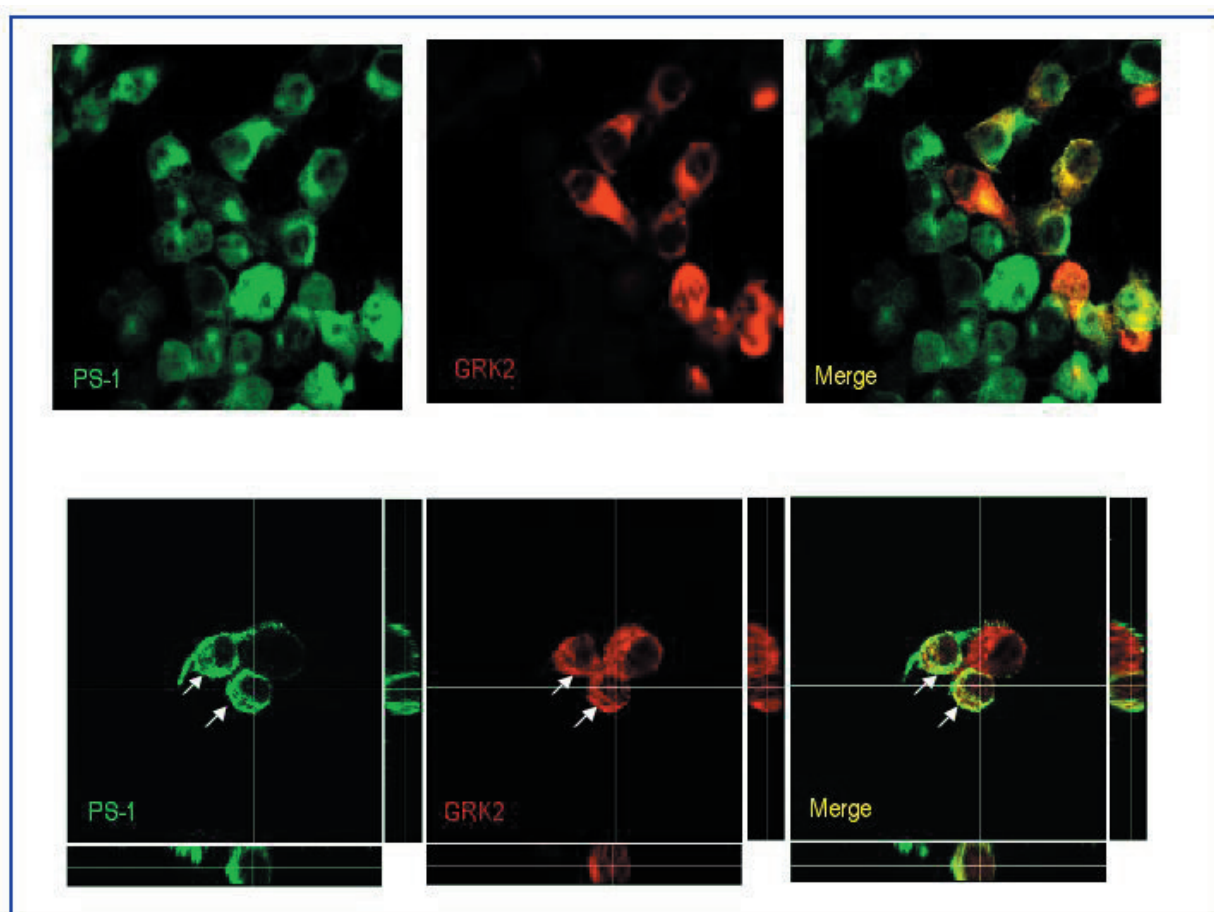
B) Co-Inmunoprecipitación “in situ” de GRK2 y PS1 endógena. 8x10<sup>6</sup> células N2a transfectadas transitoriamente con 20 µg del vector vacío o de pcDNA3-GRK2 se solubilizaron en tampón de inmunoprecipitación endógena, durante 2 horas como se detalla en el apartado 15.2 de MyM. Se tomaron alícuotas de estos solubilizados (10 %) para obtener los niveles de sobre-expresión (lisados) y del resto, un 50% se utilizó para inmunoprecipitar con un anticuerpo frente a GRK2 (anticuerpo GRK2/3 monoclonal de UPSTATE) y el otro 50%, con el anticuerpo anti-PS1Nt (anticuerpo H-70 de Santa Cruz), como se detalla en el apartado 15.2 de MyM. Los complejos inmunes (IP) se resolvieron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida del 12%. Tras electrotransferencia, las proteínas se detectaron con anti-PF2 (dil 1:500) y anti-PS1H-70 (dil 1:500), como se detalla en la figura. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos.

Estos ensayos, donde se sobre-expresa PS1, muestran la asociación entre la forma no procesada de PS1 (ver apartado 3.1.1 de la Introducción) y GRK2, pero no nos indican si esta interacción tiene lugar con la proteína endógena procesada en sus fragmentos NTF y CTF. Para abordar el estudio de la interacción endógena utilizamos como modelo experimental las células de neuroblastoma de ratón (N2a), ya que en este tipo celular los niveles de ambas proteínas son lo suficientemente elevados como para poder visualizar la interacción en nuestras condiciones experimentales y con los anticuerpos disponibles en el laboratorio. Los ensayos de co-inmunoprecipitación realizados en células N2a no transfectadas o transfectadas transitoriamente con la quinasa (**figura R 12B**), utilizando un anticuerpo frente a la región amino-terminal de PS1 (H-70), muestran la co-inmunoprecipitación de ambos fragmentos de PS1 (datos no mostrados) y además de GRK2, tanto en las células transfectadas como en las no transfectadas. Además, los niveles de co-inmunoprecipitación no aumentan de manera significativa por estar sobre-expresando la quinasa, lo que sugiere que la expresión del fragmento PS1-NTF procesado en la célula es el factor limitante (ver más tarde en la discusión).



## RESULTADOS

Por último, los ensayos de microscopía confocal realizados en células N2a transfectadas transitoriamente con GRK2 (**figura R 13**) parecen indicar que ambas proteínas presentan un patrón de distribución similar en la célula, co-localizando en el retículo endoplásmico. El hecho de que ambas proteínas estén presentes, a altos niveles, en el mismo compartimiento celular, apoya los resultados de interacción obtenidos.



**FIGURA R 13.- PS1 Y GRK2 CO-LOCALIZAN EN LA CÉLULA.**

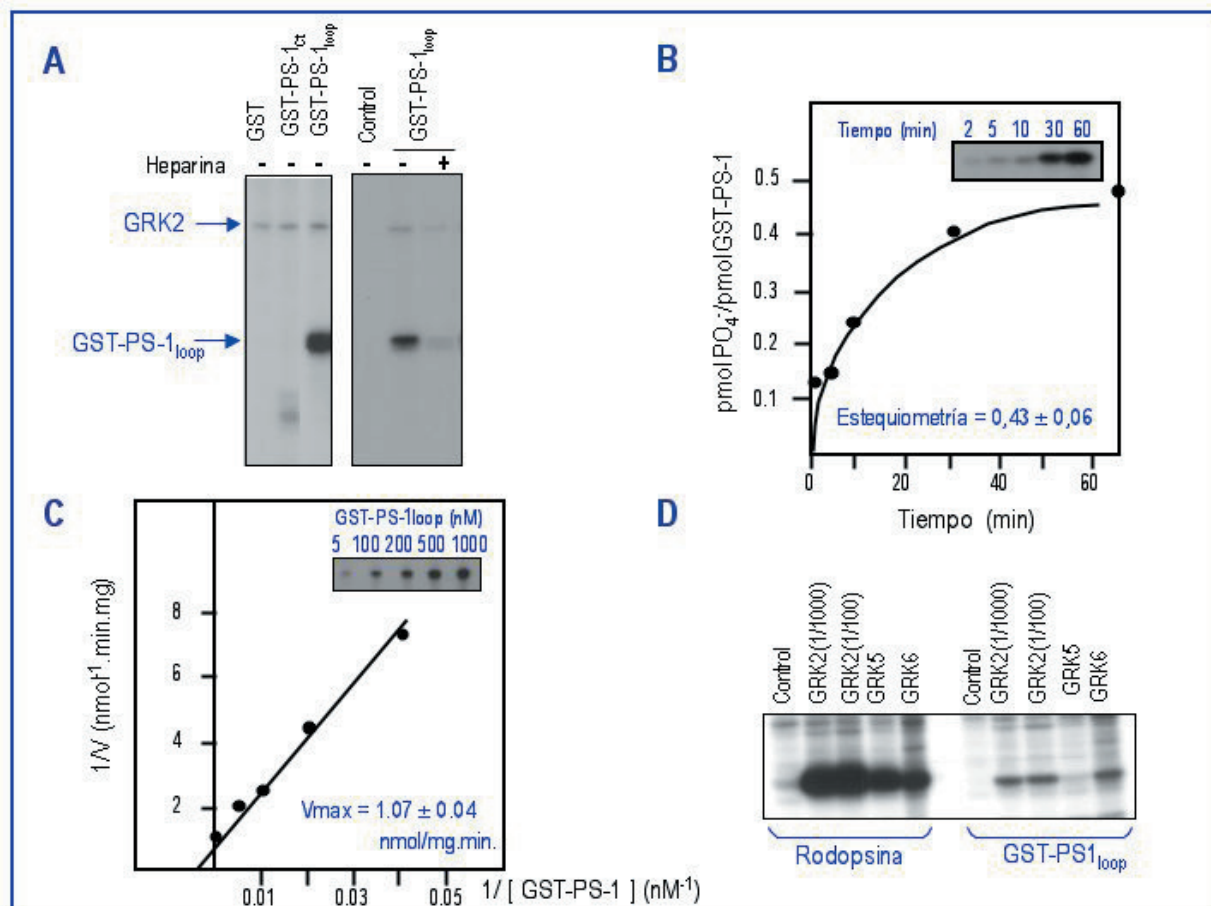
Células N2a se sembraron sobre cristales de 35mm, pre-tratados con poli-lisina (SIGMA) (10  $\mu$ g/ml), y se transfectaron con pcDNA3-GRK2, como se detalla en el apartado 3.4.1 de MyM. 48 horas después de la transfección, las células se fijaron con formaldehído al 3.7% y se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol (ver MyM, apartado 15.3). A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo monoclonal para GRK2 (GRK2/3, UPSTATE) y policlonal para PS1 (anti-PS1<sub>loop</sub>, Calbichem). Como fluoróforos se utilizaron anti-ratón Alexa-488 (invitrogen, dil 1:500) (verde) para detectar PS1 y anti-conejo Alexa-594 (invitrogen, dil 1:500) (rojo) para detectar GRK2. En la figura se muestra la imagen obtenida por microscopía confocal (microscopio Confocal Microrradiance). En la parte superior de la figura se muestran una preparación y en la inferior se muestra otra más ampliada para apreciar mejor la co-localización (flechas blancas).

En definitiva, los resultados parecen indicar que PS1 y GRK2 están interaccionando de manera directa y que podrían encontrarse en el mismo complejo macromolecular dentro de la célula.

### 2.3.- Caracterización de la fosforilación de PS1 por GRK2.

El hecho de que GRK2 y PS1 interaccionen en la célula y que, según resultados previos, GRK2 fosforile el bucle citoplasmático de PS1, nos llevó a caracterizar la fosforilación de presenilina por la quinasa.

Los primeros ensayos se centraron en la caracterización de la fosforilación de los dominios bucle citoplasmático y carboxilo terminal de PS1 (100 nM) por GRK2 recombinante (25 nM), utilizando la proteína GST purificada como control negativo de fosforilación. Como se observa en la **figura R 14A**, el bucle citoplasmático de PS1 (aminoácidos 295-374) es sustrato de fosforilación de la quinasa mientras que el dominio carboxilo terminal (aminoácidos 454-467), que sí interacciona con GRK2 (**figura R 11A**), no se fosforila, como era de esperar, dado que carece de residuos Ser o Thr en su secuencia. Además, la fosforilación del bucle citoplasmático de PS1 se inhibe por la presencia de heparina en el ensayo de fosforilación (**figura R 14A**, panel de la derecha).



**FIGURA R 14.- FOSFORILACION DEL BUCLE CITOPASMÁTICO DE PS1 POR GRK2.**

A) Ensayos de fosforilación "in vitro" de las proteínas de fusión GST-PS1<sub>loop</sub> y GST-PS1<sub>ct</sub> por GRK2. Los ensayos se realizaron como se indica en el apartado 13.1 de MyM. Las distintas proteínas de fusión (100 nM) se incubaron con GRK2 recombinante (50 nM) en tampón de fosforilación durante 30 minutos a 30°C, en presencia o ausencia del inhibidor de la quinasa heparina (0.8 µM, SIGMA). La reacción se detuvo por adición de tampón de carga de electroforesis. Las muestras se resolvieron en geles de SDS-poliacrilamida al 12%. Se presenta la autorradiografía de un gel representativo de, al menos, tres experimentos independientes. La migración de GRK2 y GST-PS1<sub>loop</sub> se indica con flechas en la figura.

B) Curso temporal de la fosforilación del GST-PS1<sub>loop</sub> por GRK2. GST-PS1<sub>loop</sub> (100 nM) se incubó con GRK2 recombinante (50 nM) en tampón de fosforilación, parándose la reacción por adición de tampón de carga a los tiempos indicados. Las muestras se procesaron como en A. Las bandas correspondientes a GST-PS1<sub>loop</sub> se cortaron del gel y se analizó la radioactividad incorporada por Cerenkov (Mathews, 1968) a los 30 min. para determinar la estequiometría de la fosforilación, como se detalla en el apartado 13.1 de MyM. Se muestra una autorradiografía representativa. Los datos de estequiometría son la media ± ESM de, al menos, tres experimentos independientes.

C) Ensayos de saturación de la fosforilación de GST-PS1<sub>loop</sub> por GRK2. Como se indica en la figura, distintas concentraciones de GST-PS1<sub>loop</sub> (de 50 nM a 1 mM) se incubaron con 50 nM de GRK2 durante 15 min a 30°C. Las muestras se procesaron como en el apartado A. Se presenta una autorradiografía representativa. Los datos son media ± ESM de, al menos, tres experimentos independientes.

D) Fosforilación de GST-PS1<sub>loop</sub> por distintas GRKs. 100 nM de rodopsina o GST-PS1<sub>loop</sub> se incubaron con 10 µg de extractos citosólicos procedentes de células Sf9 infectadas con distintas diluciones de baculovirus de GRK2, GRK5, y GRK6 (apartado 9.2.1 de MyM) durante 30 minutos a 4°C. Las muestras se procesaron como en apartados anteriores. Se presenta la autorradiografía de un gel representativo de 2 ensayos independientes.

## RESULTADOS

Estos datos van en línea con lo descrito para otras quinasas que actúan sobre PS1, ya que todas fosforilan el bucle citoplasmático: PKA y PKC fosforilan en las Ser310 y Ser346, respectivamente, (Fluhner, 2004), GSK3 $\beta$  fosforila en las Ser353 y Ser357 (Kirschbaum, 2001a y b), Cdk5 en la Ser354 (Lau, 2002) y JNK en la Ser319 y T320 (Kuo, 2008).

En la **figura R 14B** se presenta el curso temporal de la reacción, donde se observa que la fosforilación de GST-PS1<sub>loop</sub> por GRK2, en las condiciones experimentales señaladas, muestra una  $t_{1/2}$  de 15-20 minutos. La estequiometría de la fosforilación es de  $\approx 0,43 \pm 0,06$  pmol Pi incorporado/pmol PS1<sub>loop</sub> que, aunque menor que la que hemos descrito para DREAM, es similar a la encontrada “in vitro” para otros sustratos de esta quinasas.

Los datos de saturación de la fosforilación (**figura R 14C**) revelan una constante de Michaelis ( $K_m$ ) para la reacción de fosforilación de  $123 \pm 16$  nM y una velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) de  $1,07 \pm 0,04$  nmol Pi/min.mg de proteína. Como en el caso de la fosforilación de DREAM por GRK2, los valores de  $K_m$  están en el rango de nM, señalando al dominio citoplasmático de PS1 como posible sustrato endógeno de la quinasas.

### 2.4.- Fosforilación de PS1 por otras GRKs.

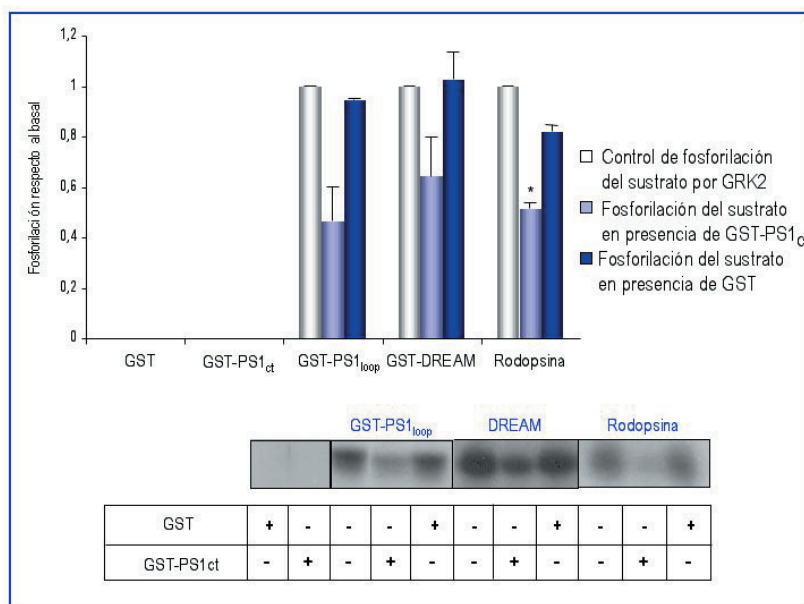
Nos pareció interesante determinar si, además de GRK2, hay otros miembros de esta familia de quinasas podrían fosforilar PS1. Para abordar este punto, se incubó el dominio citoplasmático de PS1 (GST-PS1<sub>loop</sub>) con distintas GRKs recombinantes. Debido a que la actividad de algunas de las proteínas purificadas disminuye drásticamente tras su purificación, se utilizaron preparaciones de extractos citosólicos de células Sf9 infectadas con distintas diluciones de baculovirus para las distintas GRKs de las que se disponía en el laboratorio. Como se observa en la **figura R 14D**, citosoles de células infectadas con baculovirus para GRK2 y GRK6, pero no para GRK5, fosforilaban el bucle citosólico de PS1. Como controles de actividad de los citosoles se incluyó rodopsina. Los resultados permiten deducir que GST-PS1<sub>loop</sub> es fosforilada también por GRK6 y que la no fosforilación por GRK5 no se debe a la falta de actividad de la quinasas.

Por tanto, algunos de los miembros de la familia de las GRKs son Ser/Thr quinasas implicadas en la fosforilación y, posiblemente, en la modulación de presenilinas.

### 2.5.- Modulación de la actividad de GRK2 por el dominio carboxilo terminal de PS1.

Los datos presentados hasta el momento indican que aunque GRK2 puede interaccionar tanto con el bucle citoplasmático de PS1 (aa 295-374) como con el dominio carboxilo terminal (aa 454-467) (**figura R 11A**), sólo el bucle citosólico es sustrato de la quinasas (**figura R 14A**).

En base a esto, parecía interesante determinar si la interacción de GRK2 con el extremo carboxilo-terminal de PS1 ejercía algún efecto sobre el estado de actividad de la quinasas. Para caracterizar este fenómeno, realizamos ensayos de fosforilación por GRK2 de distintos sustratos conocidos de esta quinasas, incluyendo receptores de membrana (rodopsina), sustratos solubles (DREAM) y la propia proteína de fusión GST-PS-1<sub>loop</sub>, en presencia o ausencia de la proteína de fusión del dominio carboxilo terminal GST-PS-1<sub>ct</sub>. El dominio carboxilo terminal provoca una disminución similar en la fosforilación de todos los sustratos ensayados (**figura R 15**). Es posible, por tanto, que la interacción con el dominio carboxilo terminal de PS1 pueda modular la actividad de GRK2.



**FIGURA R 15.- EFECTO DEL DOMINIO CARBOXILO TERMINAL DE PS1 EN LA ACTIVIDAD DE GRK2.**

Ensayo de fosforilación de 100 nM de GST-PS1<sub>loop</sub>, 50 nM de GST-DREAM y 20 nM de rodopsina por 50 nM GRK2, en presencia o ausencia de 100 nM de GST-PS1<sub>ct</sub>. Se realizaron como se indica en apartado 13.1 de MyM, siendo procesadas las muestras como se describe en figuras anteriores. La inhibición de la fosforilación se cuantificó por densitometría de la autorradiografía frente al control sin GST-PS1<sub>ct</sub>. Se representa el diagrama de barras de la media  $\pm$  ESM de 3 experimentos realizados. \*  $p < 0,1$  por el test de T-student. Se incluye la autorradiografía de un gel representativo.

## 2.6.- La interacción entre PS1 y GRK2 es dependiente de agonista y de la internalización de GPCRs.

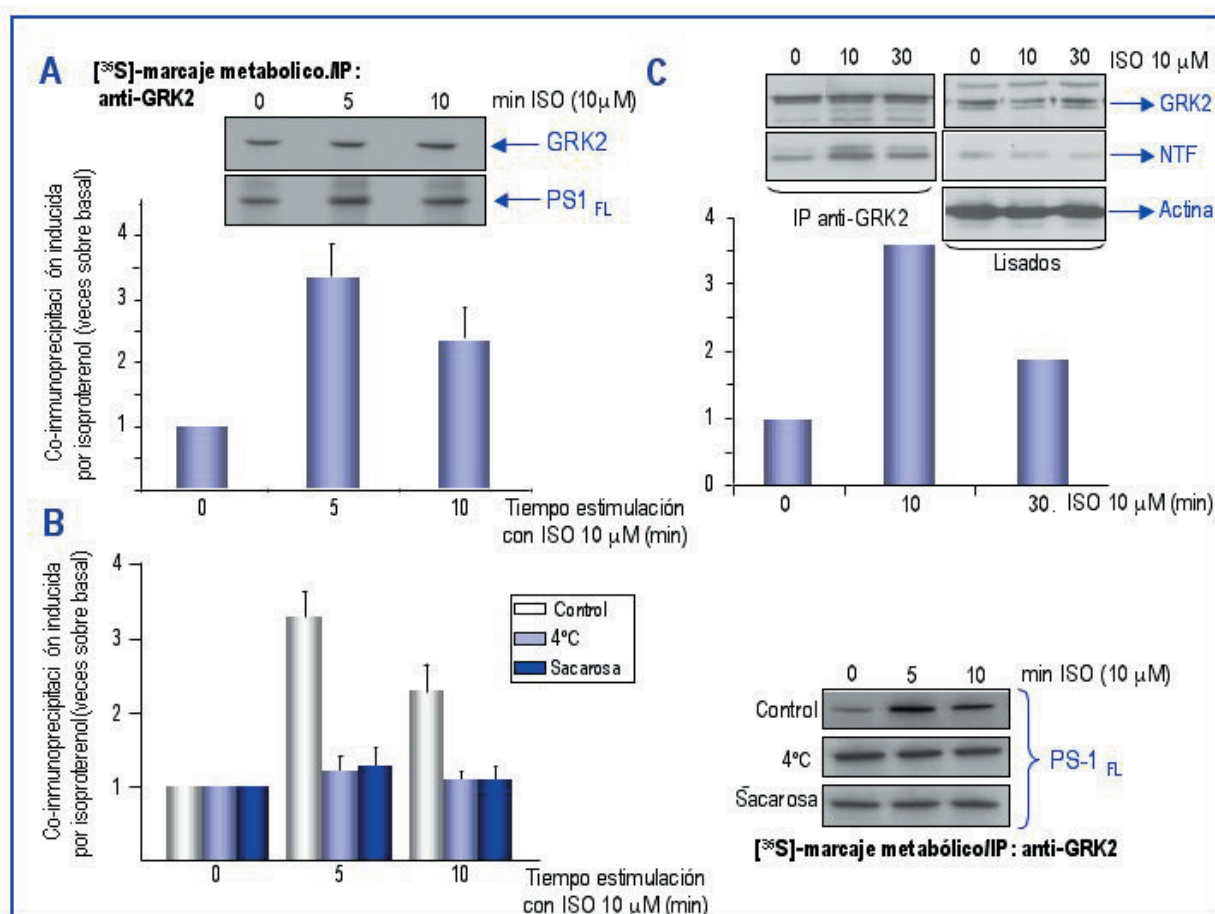
Un aspecto importante para entender las posibles implicaciones funcionales de la interacción entre GRK2 y PS1 era su posible modulación por vías de señalización celular. Dado que: (i) el reclutamiento de la quinasa al entorno del receptor puede favorecer su actividad o su interacción con otros sustratos (Penela, 2006), (ii) los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos ( $\beta_2$ -AR) se expresan en hipocampo y en corteza, principales regiones del cerebro implicadas en la enfermedad de Alzheimer, y (iii) la activación de este tipo de GPCRs estimula la actividad  $\gamma$ -secretasa y acelera la formación de placas seniles en el cerebro (Ni, 2006), quisimos investigar si la estimulación de  $\beta_2$ -AR podría favorecer la interacción de GRK2 con presenilina.

Para comprobar esta hipótesis realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación en células HEK-293 transfectadas transitoriamente con  $\beta_2$ -AR, GRK2 y PS1 entera y marcadas metabólicamente con [ $^{35}$ S]-Met durante 2 horas, antes de ser estimuladas. En la **figura R 16A** se observa que la co-inmunoprecipitación de PS1 y GRK2 es máxima a los 5 minutos de estimulación con isoproterenol, alcanzado un aumento de  $\approx 3$  veces sobre el basal no estimulado. Además, esta interacción parece ser transitoria, ya que a partir de los 10 minutos de estimulación, comienza a disminuir. Por tanto, hay un incremento de la interacción entre PS1 y GRK2 promovido por agonista.

Por otro lado, durante el desarrollo de este trabajo se publicó que la activación de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos y  $\delta$ -opioides estimulaban la actividad  $\gamma$ -secretasa y la producción del péptido A $\beta$ , siendo este efecto dependiente de la internalización y del tráfico del complejo  $\gamma$ -secretasa a endosomas tardíos (Ni, 2006). Al igual que ocurre con la activación de  $\gamma$ -secretasa dependiente de activación adrenérgica, nuestros resultados muestran (**figura R 16B**) que la interacción entre PS1 y GRK2 es, también, dependiente del proceso de internalización del receptor  $\beta_2$ -AR pues, a 4°C o en condiciones hipertónicas de sacarosa, la cantidad de PS1 co-inmunoprecipitada no varía con el tiempo en presencia del estímulo.

Como en casos anteriores, decidimos comprobar si esta modulación de la interacción entre ambas proteínas, promovida por agonista, se producía en condiciones de no sobre-expresión en la célula. Datos preliminares muestran (**figura R 16C**) que la estimulación con isoproterenol de células N2a también conlleva un aumento transitorio en la interacción entre GRK2 y los fragmentos de PS1, siendo máxima ( $\approx 2,5$  veces sobre el basal) a los 10 minutos de estimulación.

## RESULTADOS



**FIGURA 16.- LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES ADRENÉRGICOS AUMENTA LA INTERACCIÓN ENTRE GRK2 Y PS DE FORMA DEPENDIENTE DE INTERNALIZACIÓN.**

A) Incremento de asociación entre PS1 y GRK2 por estimulación adrenérgica. Células HEK-293 transfectadas transitoriamente con PS1/GRK2/ $\beta_2$ AR, se marcaron con [<sup>35</sup>S]-Met (0,5 mCi/p100) durante 3 horas. Tras el marcaje, las células se estimularon con isoproterenol (ISO) (10  $\mu$ M) (3.8.1 de MyM) durante los tiempos indicados en la figura. A continuación, las células se solubilizaron en medio de solubilización CHAPSO (apartado 15.2 de MyM) durante 2 horas, a 4°C, con agitación. Se tomaron alícuotas de estos solubilizados (10 %) para obtener los niveles de sobre-expresión y el resto de proteínas marcadas se inmunoprecipitaron con el anticuerpo específico anti-GRK2, procesándose como se especifica en el apartado 15.2 de MyM. La detección de PS1 y GRK2 en los lisados se realizó utilizando los anticuerpos anti-PS1 H-70 (Santa Cruz) y anti-GRK2 (anti-PF2). Se muestra la fluorografía representativa de tres experimentos así como el diagrama de barras que representa la media  $\pm$  ESM del aumento de co-inmunoprecipitación con respecto al basal (no tratamiento con isoproterenol) (\*p<0,1 por T-student).

B) El incremento de la asociación entre PS1 y GRK2 dependiente de estímulo requiere internalización. En este apartado se procede del mismo modo que en el anterior pero, en este caso, las células fueron tratadas con sacarosa (750 mM/ 1 hora antes de la estimulación con isoproterenol) o estimuladas con el agonista a 4°C, como se describe en el apartado 3.8.1 de MyM. La lisis, inmunoprecipitación y análisis se realizó como en el apartado A. Se presenta el diagrama de barras de la media  $\pm$  ESM (\*p<0,1 por T-student) y una fluorografía representativa de tres experimentos.

C) El incremento en la interacción entre fragmentos NTF/CTF de PS1 y GRK2 endógenas es dependiente de activación de receptores adrenérgicos. Células N2a fueron estimuladas con isoproterenol (ISO) (10  $\mu$ M) durante los tiempos indicados en la figura. A continuación, las células se solubilizaron en tampón de inmunoprecipitación endógena durante 2 horas, como se describe en el apartado 15.2 de MyM. Se tomaron alícuotas de estos solubilizados (10 %) para obtener los niveles de sobre-expresión y el resto de proteínas se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-GRK2 (anticuerpo GRK2/3 monoclonal de UPSTATE) durante la noche a 4°C. Los complejos inmunes (IP) se resolvieron en geles SDS-poliacrilamida al 12%. Tras electrotransferencia, las proteínas se detectaron con anti-PF2 y anti-PS1H-70, como se detalla en la figura. Se presenta el diagrama de barras de la co-inmunoprecipitación con respecto al basal (no tratamiento con ISO) determinado por densitometría y corregido por GRK2 inmunoprecipitada.



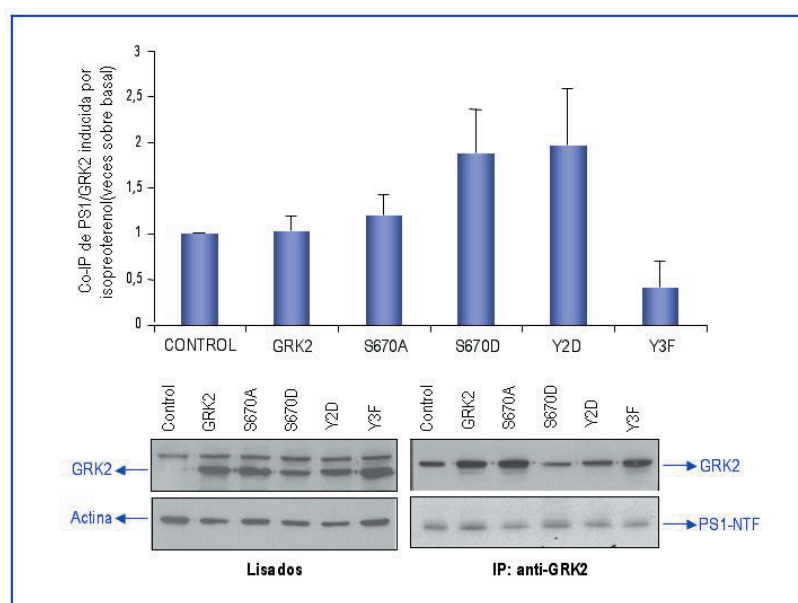
En resumen, se produce un aumento en la interacción entre PS1 y GRK2 mediado por la activación por agonistas de receptores  $\beta$ -adrenérgicos y dependiente de procesos de internalización.

## 2.7.- La fosforilación de GRK2 dependiente de MAPK y c-Src favorece la interacción con PS1.

Como mencionamos en la introducción, la actividad y las interacciones funcionales de GRK2 son reguladas por la acción de diferentes quinasas. La fosforilación por ERK1 de GRK2, en su Ser 670, reduce la asociación de la quinasa con la subunidad  $G\beta\gamma$  y su actividad frente a receptores (Elorza, 2000), mientras que la fosforilación por c-Src de las tirosinas N-terminales de GRK2 (Sarnago, 1999), además de incrementar la actividad catalítica de GRK2, favorece su asociación con  $G\alpha_q$  (Mariggio, 2006).

Dado que tanto la interacción entre PS1 y GRK2 como las fosforilaciones de GRK2 por c-Src o ERK son promovidas por la estimulación de GPCRs, nos planteamos analizar el efecto de estas modificaciones post-traduccionales en la asociación de GRK2 con PS1. Para ello, llevamos a cabo experimentos de asociación de PS1 y mutantes de GRK2 en residuos de fosforilación de c-Src y MAPK, que mimetizan bien el estado permanentemente fosforilado (GRK2-S670A, GRK2 Y2D), bien el estado no fosforilado (GRK2-S670A, GRK2 Y3F) producidos en la quinasa tras la estimulación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Elorza, 2000; Sarnago, 1999).

Tal y como se observa en la **figura R 17**, los ensayos de co-inmunoprecipitación realizados en células N2a no transfectadas o transfectados transitoriamente con GRK2 salvaje o sus mutantes de fosforilación muestran una mayor afinidad de PS1 endógena por GRK2 fosforilada, tanto por ERK como por c-Src, observándose un aumento de la co-inmunoprecipitación de PS1 frente al basal no transfectado de  $1,87 \pm 0,68$  y  $1,96 \pm 0,87$ , respectivamente.



**FIGURA R 17.- INTERACCIÓN DE PS1 Y MUTANTES DE FOSFORILACIÓN POR MAPK Y c-Src DE GRK2.**

Co-inmunoprecipitación "in situ" de los mutantes de fosforilación de GRK2 y PS1 endógena.  $8 \times 10^6$  células N2a transfectadas transitoriamente con 20  $\mu$ g del vector vacío, pcDNA3.1-GRK2 salvaje, mutantes no fosforilables de GRK2 (pcDNA3-GRK2S670A, pcDNA3-GRK2Y3F) o mutantes constitutivamente fosforilados (pcDNA3-GRK2S670D, pcDNA3-GRK2Y2D) (apartado 3.3.1 de MyM) se solubilizaron en tampón de inmunoprecipitación endógena, durante 2 horas (apartado 15.2 de MyM). Se tomaron alícuotas de estos solubilizados (10 %) para obtener los niveles de sobre-expresión (lisados) y el resto se utilizó para inmunoprecipitar con un anticuerpo frente a GRK2 (anticuerpo GRK2/3 monoclonal de UPSTATE) (apartado 15.2 de MyM). Los complejos inmunes (IP) se resolvieron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida del 12%. Tras electrotransferencia, las proteínas se detectaron con anti-PF2 (dil 1:500) y anti-Presenilin (Abcam) (dil 1:1000), como se detalla en la figura. Se muestra el diagrama de barras que representa la media de la co-inmunoprecipitación de PS1 (normalizada por la cantidad de GRK2) respecto al basal sin transfectar  $\pm$  ESM, así como una imagen representativa de tres experimentos.

## RESULTADOS

### 2.8.- Repercusiones funcionales de la fosforilación de PS1 por GRK2.

Durante los últimos años se ha descrito que la fosforilación de presenilina por varias quinasas en residuos distintos afecta a la actividad  $\gamma$ -secretasa, a la localización subcelular, a la unión de PS1 a  $\beta$ -catenina y a su señalización celular, a la estabilidad del fragmento CTF de PS1 y al corte por caspasa de PS1 (Kirschenbaum, 2001; Lau, 2002; Fluhner, 2004; Flajolet, 2007; Uemura, 2007; Kuo, 2008). Por tanto, existen múltiples facetas, ya sea de PS1 como proteína o ya sea como componente del complejo  $\gamma$ -secretasa, que pueden ser modificadas por fosforilación. El haber determinado que distintos miembros de la familia de GRKs pueden fosforilar PS1, unido al hecho de que esta familia de quinasas sufre alteraciones con la edad y en la EA y que la activación de cierto tipo de receptores GPCRs (en concreto  $\beta$ 2-adrenérgicos y  $\delta$ -opioides (Ni, 2006)) estimulan la actividad  $\gamma$ -secretasa y la producción del péptido A $\beta$ , nos animó a investigar posibles efectos de los niveles de GRK2 sobre la estabilidad y función de PS1.

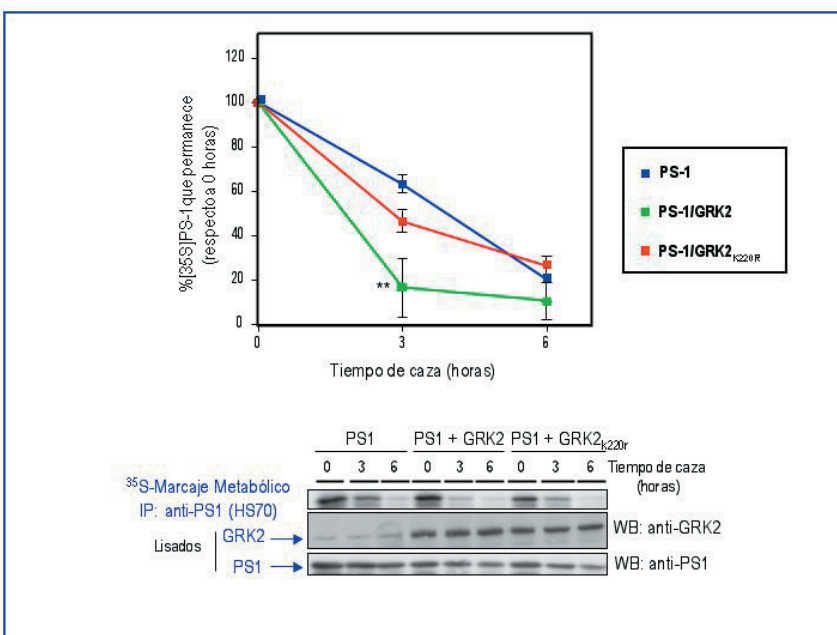
#### 2.8.1.- La fosforilación de PS1 por GRK2 modula la vida media de PS1.

Como primera aproximación experimental para determinar el efecto en PS1 de la fosforilación por GRK2, procedimos a estudiar la repercusión de GRK2 en la vida media de PS1. Para ello se realizaron experimentos de pulso y caza con [ $^{35}$ S]-Met-Cys en células HEK-293 transfectadas transitoriamente con PS1, en presencia o ausencia de GRK2 o de su mutante que carece de actividad catalítica (GRK2<sub>K220R</sub>) (Kong, 1994).

Como se observa en la **figura R 18**, la co-expresión de GRK2 provoca un aumento de la velocidad de degradación de PS1, tal que la cantidad de proteína no degradada, a las 3 horas de caza, se reduce hasta un  $16 \pm 3$  % frente al  $63 \pm 2$  % en el control de no sobre-expresión. Sin embargo, este efecto no se obtiene al sobre-expresar el mutante inactivo de la quinasa (GRK2<sub>K220R</sub>). Tanto GRK2 como el mutante GRK2<sub>K220R</sub> interactúan con la presenilina (datos no mostrados) pero, a diferencia de la forma salvaje, el mutante, al carecer de actividad catalítica, no puede llevar a cabo la fosforilación. De estos datos se podría sugerir que no es la interacción de presenilina con la quinasa sino su fosforilación lo que induce una mayor velocidad de degradación de la proteína.

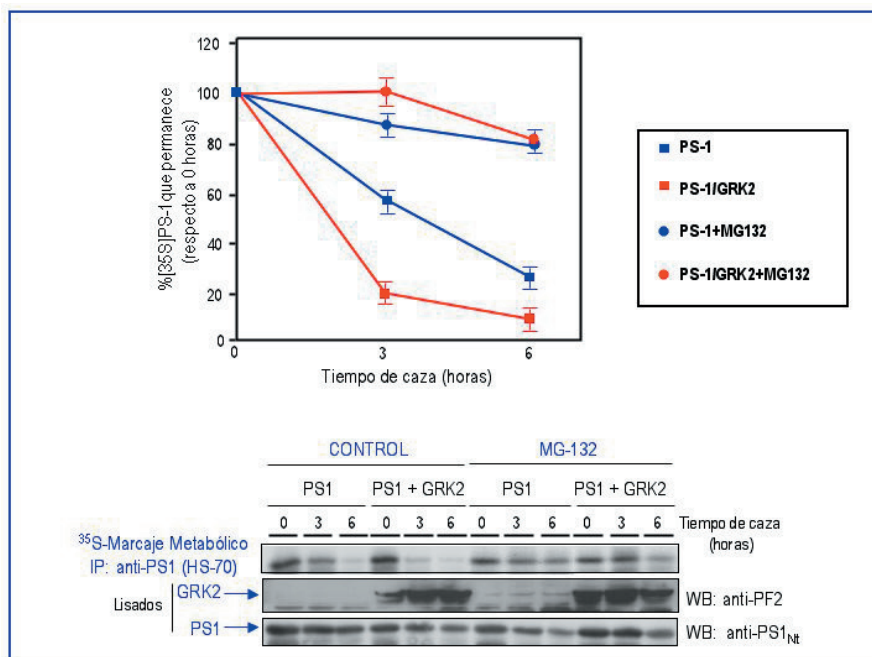
#### FIGURA R 18.- EFECTO DE GRK2 EN LA VIDA MEDIA DE PS1.

Células HEK-293, transfectadas transitoriamente con pcDNA3-PS1 o con pcDNA3-PS1 y pcDNA3-GRK2 o el mutante inactivo pcDNA3-GRK2K220R, se marcaron metabólicamente durante 20 min con [ $^{35}$ S]Met como se detalla en el apartado 12 de MyM. Transcurridos los distintos tiempos de caza indicados en la figura, las células se lisaron y solubilizaron (apartado 15.2 de MyM). Se separó un 10 % del solubilizado para determinar los niveles de sobre-expresión y el resto se utilizó para la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-PS1 H-70 (Santa Cruz) durante la noche a 4°C. Los complejos inmunes (IP) se resolvieron en geles SDS-poliacrilamida al 10% y se detectaron por fluorografía (11.1.1 de MyM). La densidad de la banda de PS1 marcada a tiempo cero (0 horas) se consideró como el 100%. Se representan las medias  $\pm$  ESM y una fluorografía típica de 3 experimentos (\*\*p < 0,01 por el test T-student).





Al igual que ocurre cuando PS1 es fosforilada por GSK3 y cdk5, la degradación inducida por fosforilación por GRK2 tiene lugar por la vía del proteasoma, siendo también este sistema el responsable de la degradación basal de la proteína (Kim, 1997; Marambaud, 1998). Como se muestra en la **figura R 19**, la presencia del inhibidor del proteasoma MG132 a una concentración de 30  $\mu$ M inhibe la degradación de PS1, independientemente de la sobre-expresión de GRK2.



**FIGURA R 19.- LA DEGRADACION DE PRESENILINA PROMOVIDA POR GRK2 TIENE LUGAR POR LA VIA DEL PROTEASOMA.**

Células HEK-293, transfectadas transitoriamente con PS1, PS1 y GRK2 o PS1 y el mutante inactivo de la quinasa (GRK2K220R) se marcaron metabólicamente con [ $^{35}$ S]-Met-Cys con un pulso de 20 minutos, en presencia o ausencia del inhibidor del proteasoma MG132 (30  $\mu$ M) (apartado 12 de MyM). Transcurridos los distintos tiempos de caza, las células se lisaron y solubilizaron como se describe en el apartado 15.2 de MyM. Los complejos inmunes (IP) se resolvieron en geles SDS-poliacrilamida al 10% y se detectaron por fluorografía (apartado 11.1.1 MyM). La densidad de las bandas de PS1

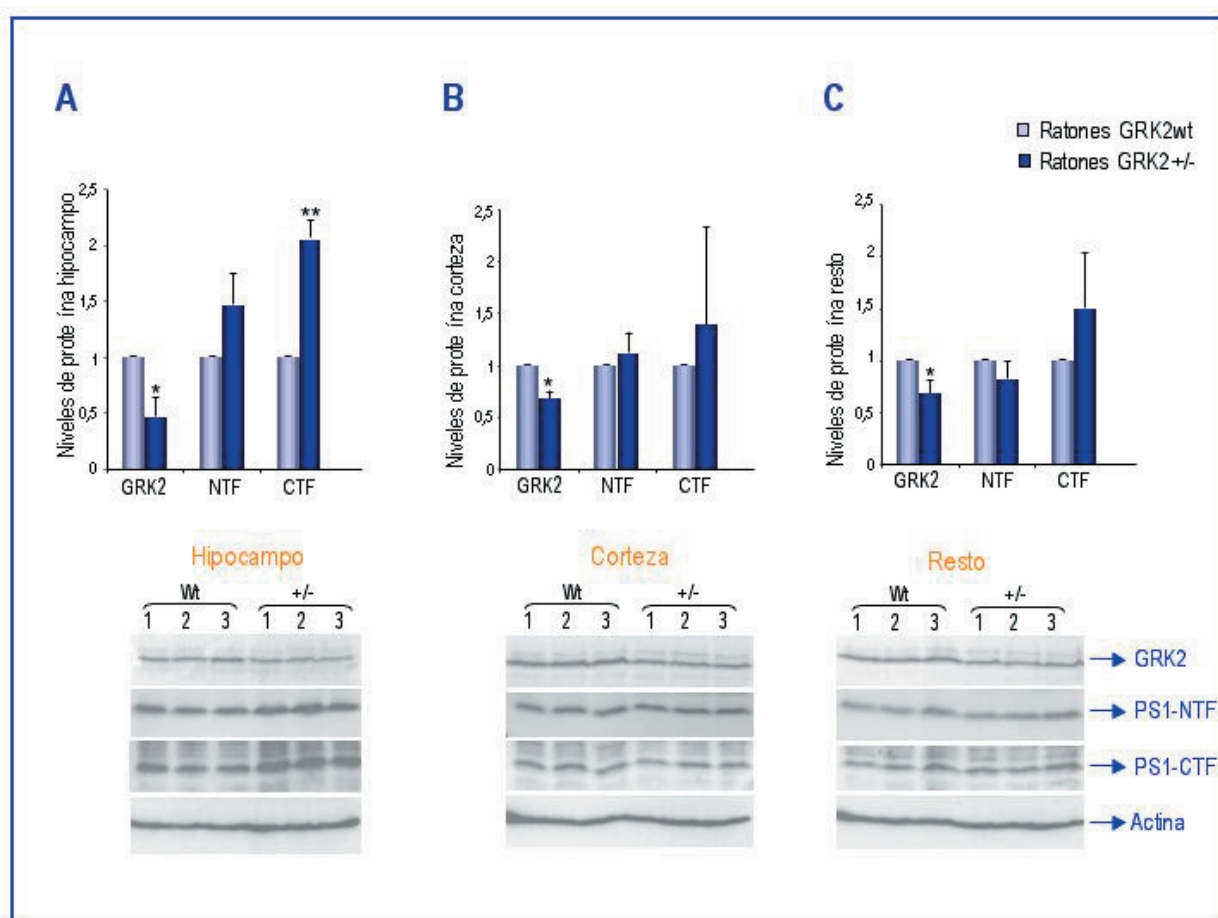
marcada a tiempo cero (tiempo 0 horas) se consideró como el 100%. Se representan las medias  $\pm$  ESM y una fluorografía de 3 experimentos. Los mismos resultados se obtuvieron al utilizar como inhibidor la Lactacistina (20  $\mu$ M, Calbiochem).

### 2.8.2.- Análisis de tejidos de ratones heterocigotos para la deficiencia de GRK2 revelan niveles alterados de PS.

Con objeto de estudiar “in vivo” el efecto de los niveles de GRK2 en el metabolismo de PS1, utilizamos los ratones GRK2 salvajes (GRK2 wt) y heterocigotos para la deficiencia de GRK2 (GRK2 +/-) disponibles en el laboratorio y caracterizamos los niveles de los fragmentos NTF y CTF de PS1 en distintas áreas del cerebro. El análisis electroforético de los lisados correspondientes a las tres regiones del cerebro (hipocampo, corteza y “resto”) (**figura R 20**) mostró una estabilización tanto del fragmento NTF como del CTF de PS1 en los ratones heterocigotos respecto a los salvajes en el hipocampo (**figura R 20A**), siendo este efecto más acusado en el caso del fragmento carboxilo terminal. Los niveles de PS1-NTF se estabilizan ( $1,46 \pm 0,28$ , respecto al basal) y los niveles de PS1-CTF llegan a duplicarse ( $2,05 \pm 0,15$ ), en condiciones de reducción de GRK2 ( $0,47 \pm 0,17$ ) frente a las condiciones salvajes.

En las otras dos regiones los niveles de PS1-NTF no se alteran de forma apreciable y los niveles de PS1-CTF, aunque parecen tener tendencia a aumentar, presentan gran variabilidad.

## RESULTADOS



**FIGURA R 20.- NIVELES DE PS1 EN CEREBROS DE RATONES SALVAJES Y GRK2 +/-.**

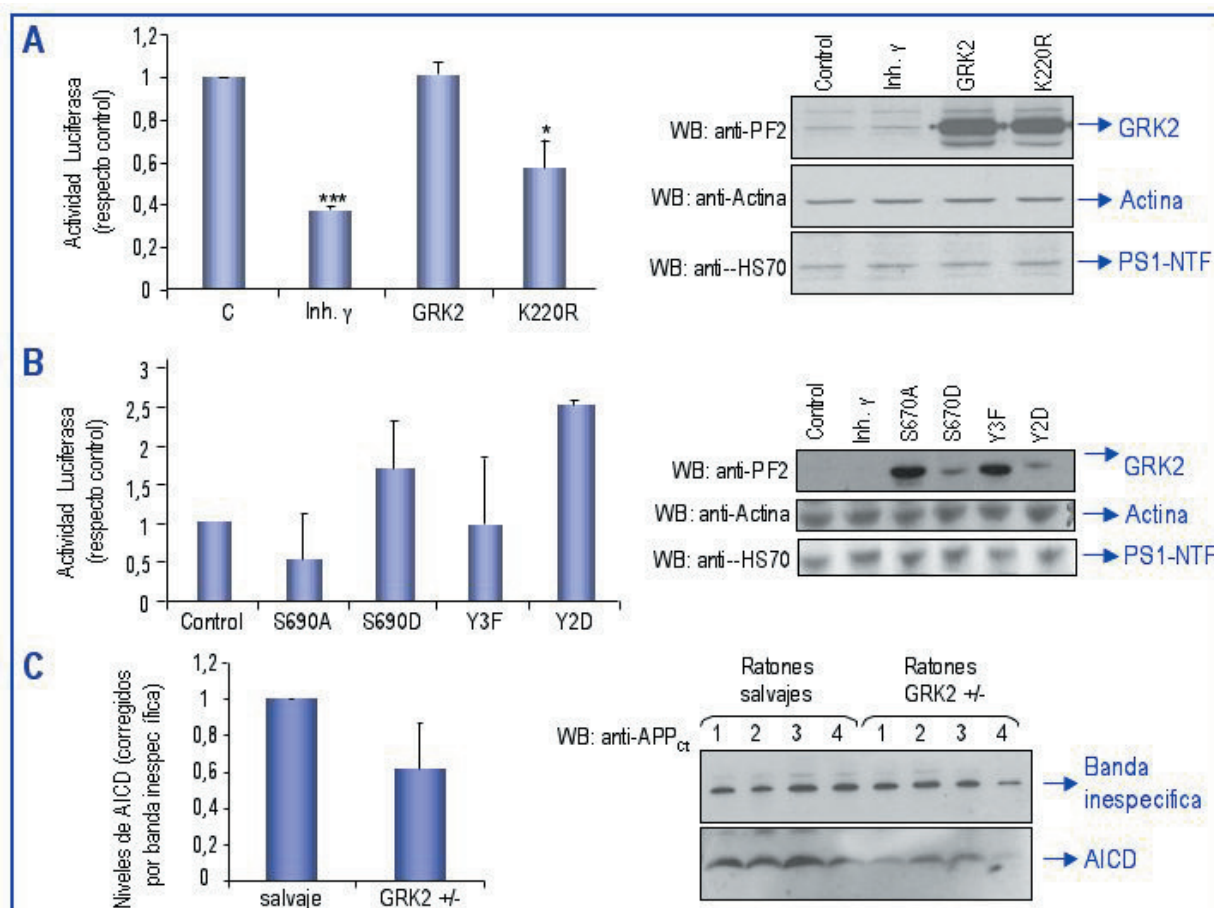
Hipocampo, corteza y el resto de otras zonas de cerebros de ratones salvajes y heterocigotos para GRK2 se procesaron y trataron como se indica en el apartado 4 de MyM. 50 µg de proteína de extractos de las distintas áreas de cada ratón se sometieron a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 12%. Para la inmunodetección tras electrotransferencia se utilizaron los anticuerpos anti-PF2, anti-PS1Nt (H-70, Santa Cruz) y anti-PS1 Loop Domain (Calbiochem) y anti-actina (I-19, Santa Cruz), utilizado como control de carga de las muestras. En la figura se presenta el diagrama de barras de los niveles de proteína (valor de la densitometría corregido por el valor de actina) obtenida como media ± ES de diez ratones salvajes y diez ratones heterocigóticos y un gel representativo. \*\*p<0.01, \*p<0.1 por el test de T-student.

### 2.8.3.- Efecto de los niveles de GRK2 en la actividad $\gamma$ -secretasa de PS1.

Además del efecto de los niveles de GRK2 en la estabilidad de PS1, analizamos su posible repercusión en la actividad  $\gamma$ -secretasa sobre APP. La elección de APP como sustrato se basó en la disponibilidad de herramientas experimentales y de datos bibliográficos que parecían indicar una posible relación entre la quinasa y este sustrato (Ni, 2006 y Suo, 2004).

El sistema seleccionado para determinar la modulación por GRK2 de la actividad  $\gamma$ -secretasa frente al APP fueron las células C99-Gal 4. Éstas son células HEK-293 estables para el fragmento C99 del APP (producto del corte  $\beta$ -secretasa y sustrato de la  $\gamma$ -secretasa) fusionado a los dominios de unión al DNA Gal 4 y de transactivación VP16 (Sadowski, 1988), permitiendo la determinación de la actividad del complejo  $\gamma$ -secretasa en función de la actividad luciferasa promovida por la unión de Gal4 al promotor (ver apartado 3.2 de MyM).

En un primer abordaje se pretendía medir la actividad  $\gamma$ -secretasa en células control y en células con menores niveles de GRK2. Así, realizamos distintas aproximaciones para reducir estos niveles mediante la infección de las células C99 con distintas MOI del adenovirus shRNA-GRK2 generado pero, lamentablemente, las células no sobrevivían el tiempo necesario, por lo que decidimos analizar el papel de K220R, que se ha descrito puede tener un efecto dominante negativo sobre la actividad de GRK2 (Kong, 1994).



**FIGURA R 21.- EFECTO DE GRK2 SOBRE LA ACTIVIDAD  $\gamma$ -SECRETASA.**

A) Efecto de GRK2 en la actividad  $\gamma$ -secretasa en células C99-Gal4. Células HEK-293 que expresan establemente C99-Gal4 se sembraron en placas previamente tratadas con poli-lisina (10  $\mu$ g/ml) y se transfectaron transitoriamente con pcDNA3.1, GRK2 o su mutante inactivo GRK2K220R. Como control positivo de la inhibición de la actividad  $\gamma$ -secretasa, parte de las células fueron tratadas con el inhibidor  $\gamma$ -secretasa L-685,458 (10  $\mu$ M) durante 24 horas (ver apartado 3.8.4 de MyM). Transcurridas 48 horas de la transfección, las células se procesaron como se detalla en el apartado 17.1 de MyM para llevar a cabo la medida de la actividad luciferasa. En la figura se muestra el diagrama de barras de la media  $\pm$  ESM de la actividad luciferasa respecto a las células no transfectadas de cuatro experimentos diferentes, así como un gel representativo de los niveles de GRK2, PS1 y actina en el ensayo. \* $p < 0.1$  y \*\*\* $p < 0.001$  por test de T-student.

B) Efecto de los mutantes de fosforilación de GRK2 sobre la actividad  $\gamma$ -secretasa. El ensayo se realizó como en el apartado A pero, en este caso, las células C99-Gal4 se transfectaron transitoriamente con el vector vacío, mutantes no fosforilables de GRK2 (GRK2-S670A y GRK2-Y3F) o mutantes constitutivamente fosforilados (GRK2-S670D y GRK2-Y2D). En la figura se muestra el diagrama de barras de la media  $\pm$  ESM de la actividad luciferasa respecto a las células no transfectadas, tras restar la actividad luciferasa después del tratamiento con L-685,458, de dos experimentos diferentes, así como un gel representativo de los niveles de GRK2, PS1 y actina en el ensayo.

C) Efecto de GRK2 en la actividad  $\gamma$ -secretasa frente APP en extractos de cerebro de ratón. Medida de los niveles del fragmento ICD de APP en preparaciones de membrana (apartado 5 de MyM) obtenidas a partir de la fracción "resto" (apartado 4 de MyM) de ratones salvajes y heterocigotos para la deficiencia en GRK2. En la figura se representa el diagrama de barras de la media de cuatro ratones salvajes y cuatro heterocigotos  $\pm$  ESM, así como el inmunomarcado tras electroforesis, utilizando el anticuerpo anti-APP<sub>ct</sub> (SIGMA) (dil. 1:4000). Como control de carga se utiliza una banda inespecífica.

## RESULTADOS

En la **figura R 21A** podemos observar que la actividad luciferasa no se ve afectada por la sobre-expresión en las células C99-Gal4 de la forma salvaje de la quinasa ( $1,01 \pm 0,11$ ), pero disminuye de forma significativa en presencia del mutante sin actividad catalítica GRK2<sub>K220R</sub> ( $0,61 \pm 0,23$ ). Por tanto, estos datos apoyan la idea de que la fosforilación por GRK2 podría estar modulando la actividad  $\gamma$ -secretasa de PS1 frente a APP. Como control del papel de PS1 en este procesamiento se incluyó un punto donde se trataban las células con el inhibidor de la actividad  $\gamma$ -secretasa L-685,458.

Puesto que la asociación entre PS1 y GRK2 se ve favorecida por la fosforilación de la quinasa por c-Src y ERK, nos planteamos estudiar su efecto en la modulación que GRK2 ejerce sobre la actividad  $\gamma$ -secretasa frente a APP. Datos preliminares muestran (**figura R 21B**) que la actividad luciferasa de las células C99-Gal 4 aumenta considerablemente cuando lo que se sobre-expresa son los mutantes constitutivamente fosforilados de GRK2, GRK2-S670D ( $1,71 \pm 0,62$ ) y GRK2-Y2D ( $2,54 \pm 0,05$ ), mientras que la sobre-expresión de los mutantes no fosforilables no afectan significativamente a la actividad luciferasa e incluso tiende a disminuir.

En definitiva, la fosforilación por GRK2 parece regular el metabolismo y la actividad  $\gamma$ -secretasa frente a APP de PS1, al igual que hacen otras Ser/Thr quinastas. Además, el efecto de la quinasa sobre la actividad de PS1 parece ser regulable por su fosforilación por c-Src y MAPK.

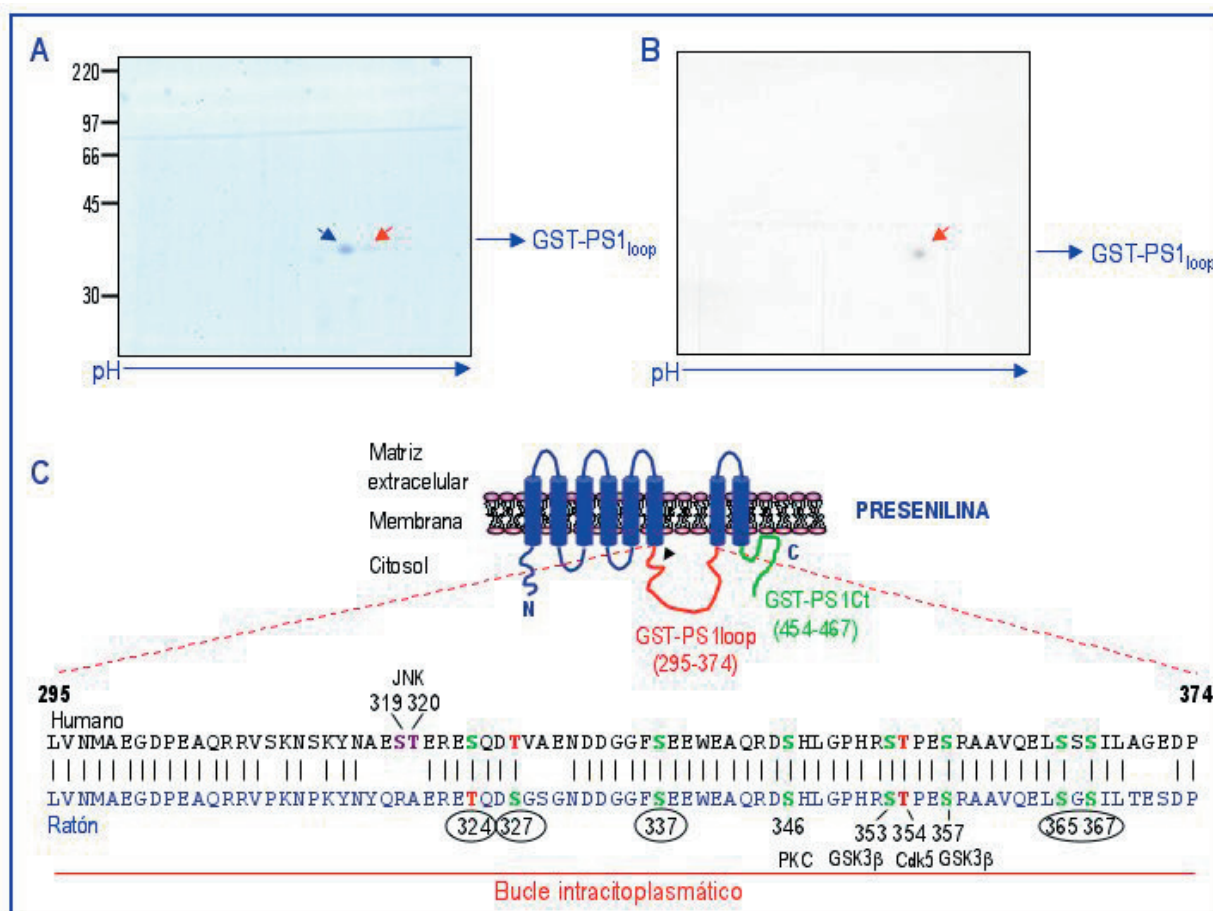
*2.8.4.- Membranas cerebrales de ratones heterocigotos para la deficiencia de GRK2 producen menores niveles del dominio intracitoplasmático (ICD) del APP.*

Así como hemos hecho en el estudio de la estabilidad de PS1, nos pareció interesante determinar la capacidad para generar el fragmento ICD de APP (ver apartado 3.2.1 de I) en preparaciones de membrana procedentes de ratones heterocigotos para la deficiencia en GRK2. Para abordar este estudio procedimos a la preparación de membranas, a partir de los extractos cerebrales de los ratones salvajes y heterocigotos (ver apartado 5 de MyM), para la determinación de la actividad  $\gamma$ -secretasa frente a APP en las regiones cerebrales anteriormente mencionadas. Sin embargo, la realización de estos ensayos requiere una concentración de membranas alta, que sólo pudo ser obtenida en la fracción “resto”. Como se muestra en la **figura R 21C**, el ensayo de actividad  $\gamma$ -secretasa frente a APP muestra una menor producción del fragmento AICD ( $0,61 \pm 0,15$ ) en los ratones heterocigotos deficientes en GRK2 respecto a los salvajes. Por tanto, la disminución de los niveles de GRK2 provoca una disminución del procesamiento del APP. Estos datos, por tanto, estarían corroborando la participación de la quinasa en la modulación de la actividad  $\gamma$ -secretasa, al menos, frente a APP.

### 2.9.- Identificación del sitio de fosforilación de PS1 por GRK2.

Para poder abordar de una forma más efectiva y específica las consecuencias funcionales de la modulación postraducciona de PS1, intentamos la identificación del/los residuo/s de fosforilación de la proteína por GRK2, con idea de generar los mutantes “no fosforilables” (cambio de Ser/Thr a Ala) o que mimetizan la forma constitutivamente fosforilada (cambio de Ser/Thr a Asp) correspondientes. Para determinar el número de sitios que resultaban fosforilados por GRK2, realizamos electroforesis bidimensionales de preparaciones de GST-PS1<sub>loop</sub> fosforiladas por la quinasa. Este análisis mostró que, aunque la mayoría de la proteína no se fosforilaba en nuestras condiciones experimentales (flecha negra, **figura R 22A**), aparecía, al menos, una banda adicional que indicaba la existencia de, como mínimo, un sitio de fosforilación en este dominio (flecha roja, **figura R 22A**). Datos que se corroboran con la autoradiografía del ensayo de fosforilación (**figura R 22B**).





**FIGURA R 22.- DETERMINACIÓN DE LOS SITIOS DE FOSFORILACIÓN DE PS1 POR GRK2.**

A) Electroforesis bidimensional de la fosforilación de GST-PS1<sub>loop</sub> por GRK2 recombinante. 3 mg de proteína de fusión GST-PS1<sub>loop</sub> purificada se incubaron con GRK2 (1,8 mg) en tampón de fosforilación durante 2-3 horas a 30°C. Tras el ensayo, las muestras se concentraron por precipitación con acetona y se sometieron a electroforesis bidimensional como se detalla en el apartado 11.1.2 de MyM. Se presenta la tinción con Azul Brillante de Coomassie R-250 de un gel representativo de 2 ensayos independientes. Con flechas se indica la migración de la proteína no fosforilada (flecha azul) o con 1 fosfato (flecha roja). B) Las fosfoproteínas se detectan por autorradiográfica.

C) Alineamiento de la secuencia del bucle citoplasmático de hPS1 y mPS1. Se presenta el alineamiento (programa MultAlin) de las secuencias comprendidas entre los aminoácidos 295 y 374 de PS1 humana (negro) (P49768) y murina (azul) (P49769). En las secuencias se indican las serinas (S) y treoninas (T) conservadas en ambas especies, indicando las Ser y Thr que han sido previamente identificadas como sitios de fosforilación por PKC (Fluhrer, R. 2004), GSK3β (Kirschenbaum, 2001), Cdk5 (Lau, 2002) o JNK (Kuo, 2008). Los círculos representan las

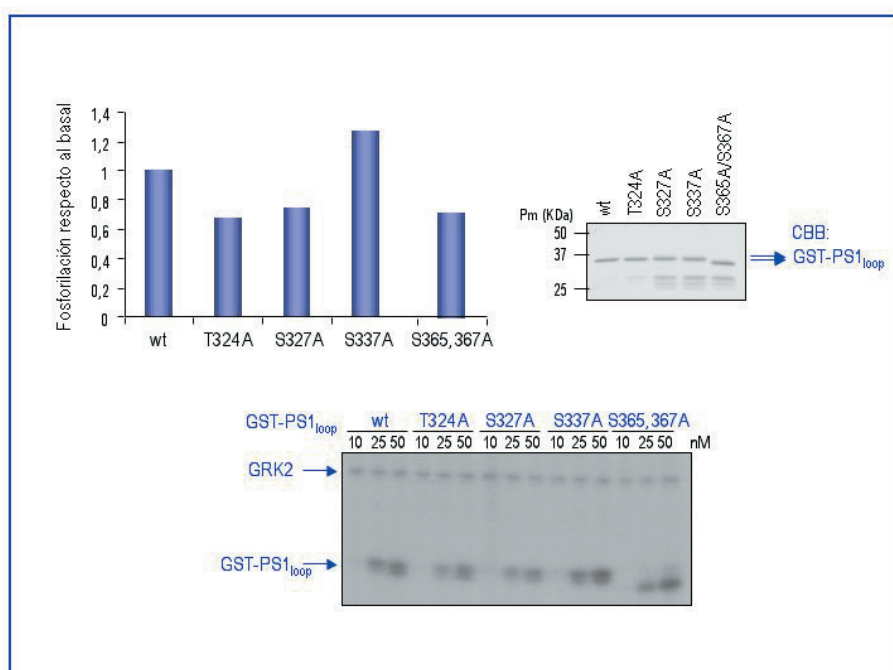
Al igual que con la proteína DREAM, hemos intentado, en colaboración con el Servicio de Proteómica del CBMSO, identificar los sitios de fosforilación de GST-PS1<sub>loop</sub> por GRK2 mediante análisis de espectrometría de masas por trampa iónica, pero los resultados no han sido claros, probablemente debido a la baja eficiencia de nuestro ensayo. Por este motivo, hemos abordado la identificación del sitio preferente de fosforilación siguiendo una estrategia diferente, basada en la realización de una serie de mutaciones a Ala de las Ser y Thr de presenilina susceptibles de ser fosforiladas por GRK2.

La proteína de fusión del bucle citoplasmático de PS1 de la que disponíamos era la proteína GST-PS1<sub>loop</sub>, proporcionada por Francisco Zafra, de origen murino. Sin embargo, nuestro interés se centraba en la búsqueda del sitio preferente de fosforilación por GRK2 de PS1 humana. Mediante el alineamiento de las secuencias murina y humana de PS1 (**figura R 22C**), identificamos las serinas o treoninas, conservadas en ambas especies, susceptibles

## RESULTADOS

en principio de ser fosforiladas por GRK2 por su cercanía a aminoácidos ácidos (Thr 324, Ser327, Ser337, Ser365 y 367) y que no hubiesen sido identificadas, hasta la fecha, como sitio de fosforilación por otras quinasas (indicadas en la figura R 22C). A continuación, generamos, en una primera aproximación, los respectivos mutantes a alanina (GST-PS1<sub>loop</sub>-T324A, GST-PS1<sub>loop</sub>-S327A, GST-PS1<sub>loop</sub>-S337A, el mutante doble GST-PS1<sub>loop</sub>-S365-367A).

Como se puede observar en la **figura R 23**, la mutación a alanina de estos residuos no impidió la fosforilación de GST-PS1<sub>loop</sub> por GRK2, aunque en el caso de los residuos Thr324 y Ser 327 se observó una disminución del 32 y del 26 %, respectivamente. Dado que estos dos residuos parecían ser los candidatos principales y en línea con los resultados obtenidos de la electroforesis bidimensional, hemos iniciado la generación del doble mutante GST-PS1<sub>loop</sub> T324A,S327A. Una vez obtenido, se comprobará que la reducción en la fosforilación sea efectiva y será utilizado para ampliar el estudio del efecto de la fosforilación de PS1 por GRK2 sobre la actividad  $\gamma$ -secretasa y sobre otras funciones de PS1.



**FIGURA R 23.- FOSFORILACIÓN DE MUTANTES DE PS1 POR GRK2.**

A) Fosforilación de mutantes de PS1. Distintas concentraciones, indicadas en la figura, de la proteína de fusión salvaje (GST-PS1<sub>loop</sub>) o de los distintos mutantes a Ala (GST-PS1<sub>loop</sub> T324A, S327A, S337A, y el doble mutante S365,367A) se incubaron con GRK2 recombinante (25 nM) en tampón de fosforilación durante 15 minutos, como se detalla en el apartado 13.1 de MyM. Se presenta el diagrama de barras de la fosforilación cuantificada por densitometría de la autorradiografía, considerando como control la fosforilación de la proteína salvaje.

A la derecha se presenta la tinción por Azul brillante de Coomassie del gel SDS-poliacrilamida al 12 % de las proteínas de fusión a GST de PS1 salvaje y mutantes. En la parte inferior se presenta una autorradiografía representativa del ensayo de fosforilación de los mutantes de PS1 por GRK2.

### 3.- LA QUINASA REGULADORA DE RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPRK2) PARTICIPA EN LA SEÑAL DE HEDGEHOG EN *DROSOPHILA*.

Como ya hemos mencionado en la Introducción, *Drosophila melanogaster* ha sido utilizada como organismo modelo para el estudio de la genética del desarrollo por varias razones: tiene un ciclo de vida corto en el que se produce una elevada descendencia, es fácil de mantener y el conocimiento de su genética está muy avanzado, incluida la secuenciación de su genoma. Pero, sin duda, la principal ventaja es que la mayoría de los genes claves para su morfogénesis están conservados evolutivamente; el 50 % de las secuencias proteicas de la mosca corresponden a proteínas homólogas en los mamíferos, lo que ha permitido avanzar en el estudio molecular de muchas vías de señalización (Adams, 2000).

Por ello, para identificar procesos biológicos en los que estén implicadas las GRKs y con objeto de buscar efectos fenotípicos de GRKs en diferentes tejidos y/o estadios del desarrollo decidimos iniciar, en colaboración con el grupo del Dr. José Félix de Celis (Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”), el estudio del papel de las proteínas GRKs en *Drosophila*. Como ya se ha comentado en la introducción, hay dos homólogos de GRKs en *Drosophila*, *Gprk1* y *Gprk2*. Aunque en la actualidad hay disponibles EST de ambos genes, al comenzar este trabajo sólo se disponía de ESTs incompletos para *Gprk2*.

Para caracterizar la función *in vivo* del ortólogo *Gprk2* (homólogo en secuencia a la subfamilia de GRK4) en el desarrollo del ala de *Drosophila*, un tejido de origen epidérmico, en primer lugar generamos diferentes herramientas que nos permitirían visualizar su expresión *in situ* y manipular los niveles de proteína en este tejido.

### 3.1.- Desarrollo de nuevas armas experimentales.

#### 3.1.1.- Generación de cDNA completo de *Gprk2*.

Aunque existen numerosos EST de *Gprk2*, ninguno de ellos comprendía la región 5' del cDNA, siendo el más completo el EST LD42147, que comprende desde los nucleótidos 332 al 2145. Por tanto, para poder llevar a cabo la sobre-expresión de *Gprk2*, así como estudios de rescate de fenotipos, era necesario obtener el cDNA completo del gen mediante el clonaje de la región 5' codificante (nucleótidos 1-331) en el extremo 5' del EST LD42147.

Para el clonaje, en una primera aproximación comenzamos por obtener RNA de embriones de moscas salvajes y, mediante una reacción de retrotranscripción (RT-PCR), obtuvimos cDNAs de *Gprk2*. Lamentablemente, los cDNAs amplificados no codificaban para *Gprk2*, como se determinó por secuenciación. Por este motivo, la nueva estrategia se basó en la amplificación, por separado, de cuatro fragmentos de DNA genómico correspondientes a los 4 exones presentes en la región 5' del mRNA (según los datos de secuencia del cromosoma 3R de *Drosophila*, <http://flybase.bio.indiana.edu/cgi-bin/getseq.html>), en cuyos extremos se incluyeron determinadas dianas de restricción para permitir su posterior clonaje en serie en el plásmido pBS (ver **figura MyM 4**).

Una vez tuvimos la región 5' completa clonada en el vector pBS, la extrajimos, mediante digestión con dianas de restricción, para llevar a cabo su clonaje en el vector pUAS-EST LD42147. De esta forma, conseguimos clonar el cDNA completo en el vector pUAS para poder realizar experimentos de sobre-expresión en el modelo de *Drosophila*, así como de sobre-expresión en células en cultivo.

#### 3.1.2.- Generación de anticuerpos policlonales frente a *Gprk2*.

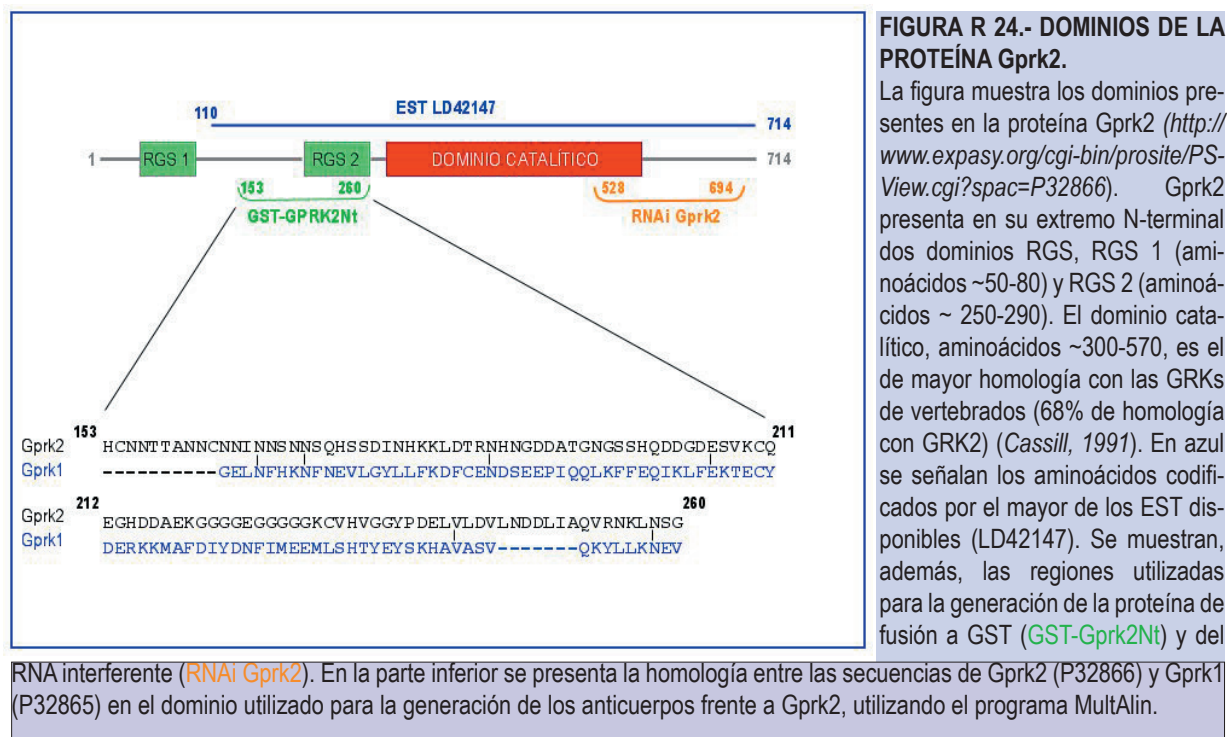
Dado que no se disponía de anticuerpos comerciales para la quinasa *Gprk2*, y que los anticuerpos frente a los distintos miembros de esta familia de proteínas de vertebrados no reconocían esta proteína de manera específica, uno de los primeros pasos que tuvimos que dar, antes de comenzar a caracterizar el papel de la quinasa en la mosca de la fruta, fue la generación de anticuerpos específicos frente a la proteína.

Para llevar a cabo la generación del anticuerpo policlonal frente a *Gprk2*, seleccionamos una región del dominio amino terminal (región comprendida entre los aminoácidos 153 y 260, **figura R 24**), ya que esta región no presenta homología con *Gprk1*. A continuación, realizamos el clonaje en fase del dominio de *Gprk2* seleccionado en el vector de expresión pGEX-2T, utilizando los oligos indicados en el apartado 2.11.3 de MyM, para poder así expresar y purificar la proteína de fusión a GST (GST-*Gprk2*<sub>NT</sub>).



## RESULTADOS

Los anticuerpos se generaron tal y como se detalla en el apartado 10 de MyM y su especificidad se determinó empíricamente por distintos métodos.

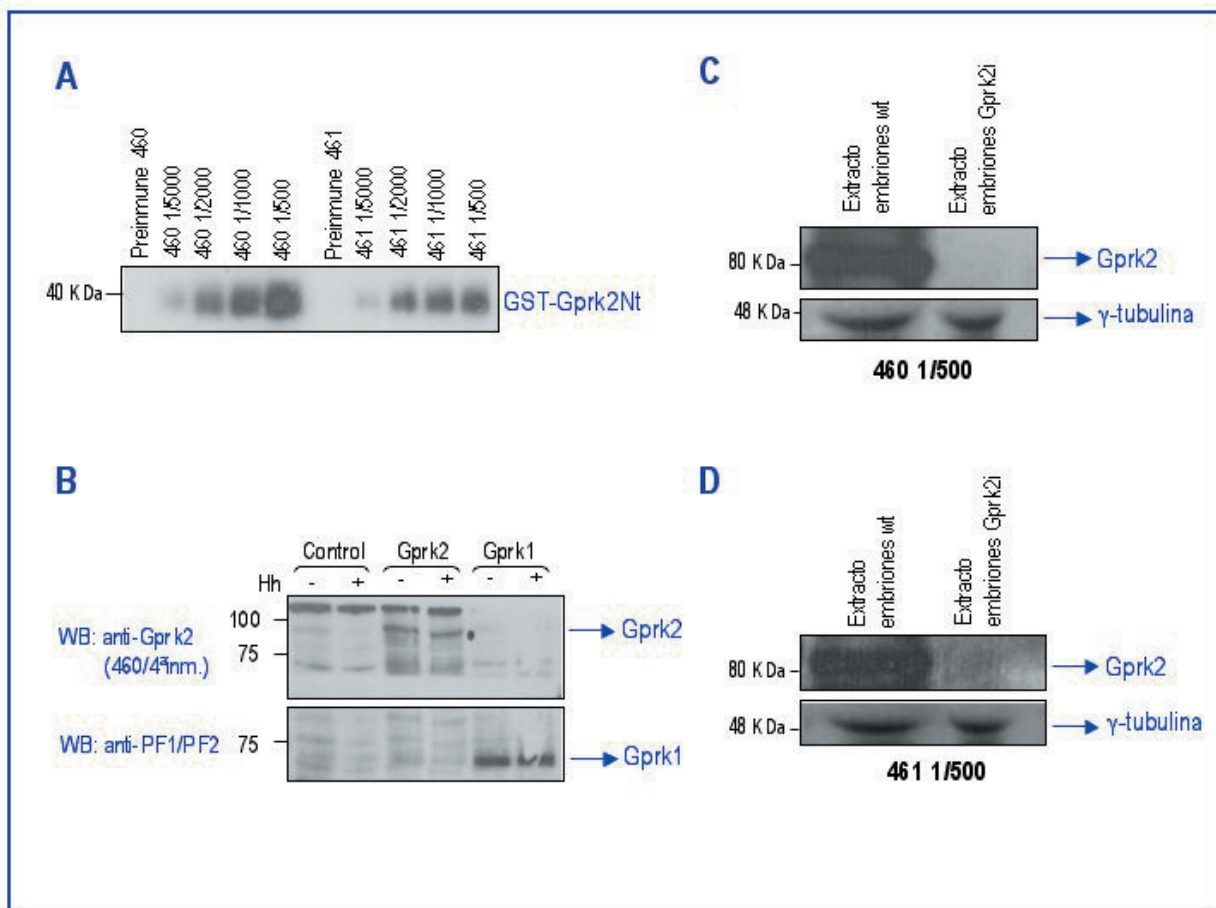


*Caracterización de los anticuerpos anti-Gprk2<sub>Nt</sub> en ensayos de inmunomarcado tras electroforesis.*

Para comprobar la especificidad y las características de los anticuerpos generados se realizaron varios experimentos de inmunodetección, tras electroforesis, en diferentes condiciones.

Primero, para determinar su título se realizaron electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 10% con pocillo corrido (48 µg de proteína). Una vez transferida la proteína y bloqueada la membrana, se procedió a utilizar un Miniblotter™ (Immunetics) para incubar la muestra con 0,5 ml de diluciones diferentes de los distintos sueros obtenidos. Como se muestra en la **figura R 25A**, tanto el anticuerpo anti-Gprk2<sub>Nt</sub> 460 como el 461 son capaces de reconocer la proteína de fusión, aunque parece que el 460 presenta un mejor título. Los sueros preinmunes se confirmaron a su vez como control negativo dado su ausencia de reconocimiento.

El anticuerpo no sólo reconoce la proteína de fusión a GST, sino también a Gprk2 sobre-expresada en células S2 (**figura R 25B**) y a la proteína endógena (**figura R 25C y 25D**), cuando se utiliza un extracto de embriones de mosca salvaje y como control negativo un extracto de embriones de mosca Gprk2i. De estos datos se concluye la especificidad, ya que no reconoce a Gprk1 sobre-expresado (**figura R 25B**), y la sensibilidad del anticuerpo al reconocer la proteína endógena en extracto de embriones (**figura R 25C y 25D**).



**FIGURA R 25.- CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI-Gprk2 POR INMUNOMARCADO TRAS ELECTROFORESIS.**

A) Titulación de los anticuerpos policlonales 460 y 461 generados frente a Gprk2. 48  $\mu$ g (por carril) de la proteína de fusión purificada se resuelven en geles de SDS-poliacrilamida al 10%. Tras su transferencia a un filtro de nitrocelulosa, se llevó a cabo la inmunodetección con las diluciones de los anticuerpos 460, 461 y sueros preinmunes indicados en la figura, tal y como se detalla en el apartado 15.1 de MyM.

B) Especificidad del anticuerpo 460. 10  $\mu$ g de extracto de células S2 transfectadas con GAL4/Actina, pUAS-Gprk2/Gal4actina o pUAS-Gprk1/Gal4actina y tratados 6h con medio condicionado de células S2 controles (-) o que sobre-expresan Hh (+), se resuelven en geles de SDS-poliacrilamida al 7%. Tras la transferencia a filtros de nitrocelulosa, se incuban con una dilución 1:500 del anticuerpo 460 generado o una mezcla de los anticuerpos frente a los dominios N-terminal (PF1) y C-terminal (PF2) de la proteína GRK2 (homóloga a Gprk1 de *Drosophila*), generados en el laboratorio. A la izquierda se indica la migración relativa de proteínas de peso molecular conocido. Con flechas se indica la banda correspondiente a Gprk2 y Gprk1 en los geles.

C, D) Los anticuerpos frente a Gprk2 460 y 461 detectan a la proteína en un lisado celular de embriones de *Drosophila*. 75  $\mu$ g de extracto de embriones de *Drosophila* salvaje (wt) o que expresan el RNAi de Gprk2 se resuelven en geles de SDS-poliacrilamida al 7%. Tras la transferencia, se utiliza el anticuerpo 460 (dil 1:500) (C) o 461 (dil 1:500) (D) para la inmunodetección de Gprk2. El inmunomarcado con  $\gamma$ -tubulina se utilizó como control de carga.

*Caracterización de los anticuerpos anti-Gprk2<sub>Nt</sub> mediante inmunofluorescencia.*

La **figura R 26** muestra los ensayos de microscopía confocal realizados en células S2 utilizando una dilución 1:100 del anticuerpo anti-Gprk2<sub>Nt</sub> 460. Estos datos nos permitieron determinar que, al igual que ocurre con sus ortólogos en vertebrados (GRK4-6), Gprk2 (rojo) se localiza en la membrana plasmática, al sobre-expresarse

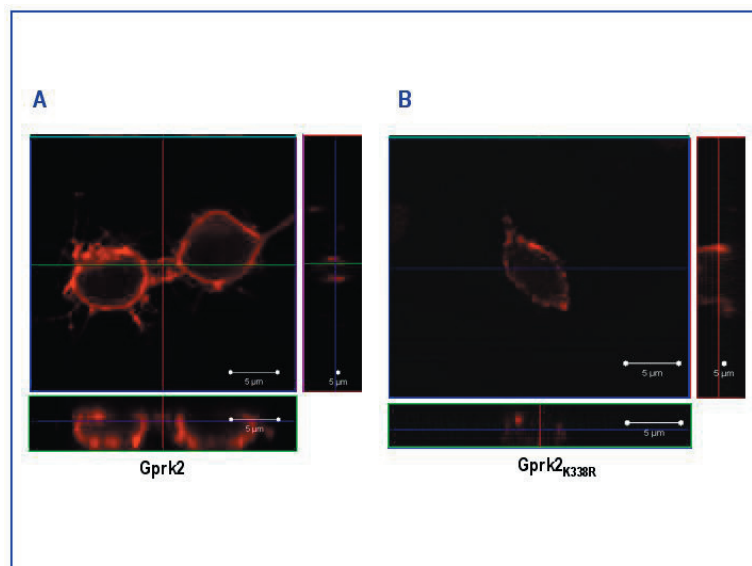
## RESULTADOS

en las células S2. Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, los anticuerpos generados no permiten observar la expresión de Gprk2 en condiciones endógenas por inmunofluorescencia.

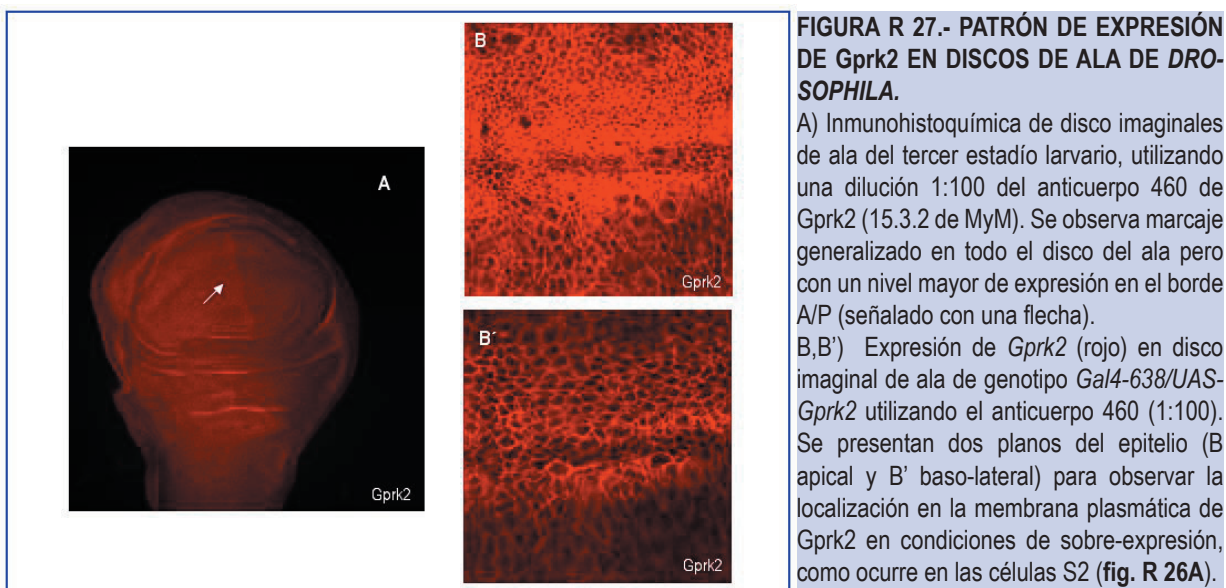
*Caracterización del anticuerpo anti-Gprk2 mediante inmunohistoquímica.*

### FIGURA R 26.- DETECCIÓN DE Gprk2 EN CÉLULAS MEDIANTE INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA.

Ensayos de inmunofluorescencia mediante microscopía confocal en células S2 transfectadas transitoriamente con pUAS-Gprk2/ActinaGal4 (A) o pUAS-Gprk2K338R/ActinaGal4 (B). Las células transfectadas transitoriamente se siembran en cristales tratados con polisina como se detalla en el apartado 15.3.1 de MyM. Tras su fijación con formaldehído al 3.7%, se incubaron con el anticuerpo anti-Gprk2 460 (dilución 1:100) y como segundo anticuerpo se utilizó el anti-IgG de conejo unido al fluoróforo Alexa 555 (Texas Red).



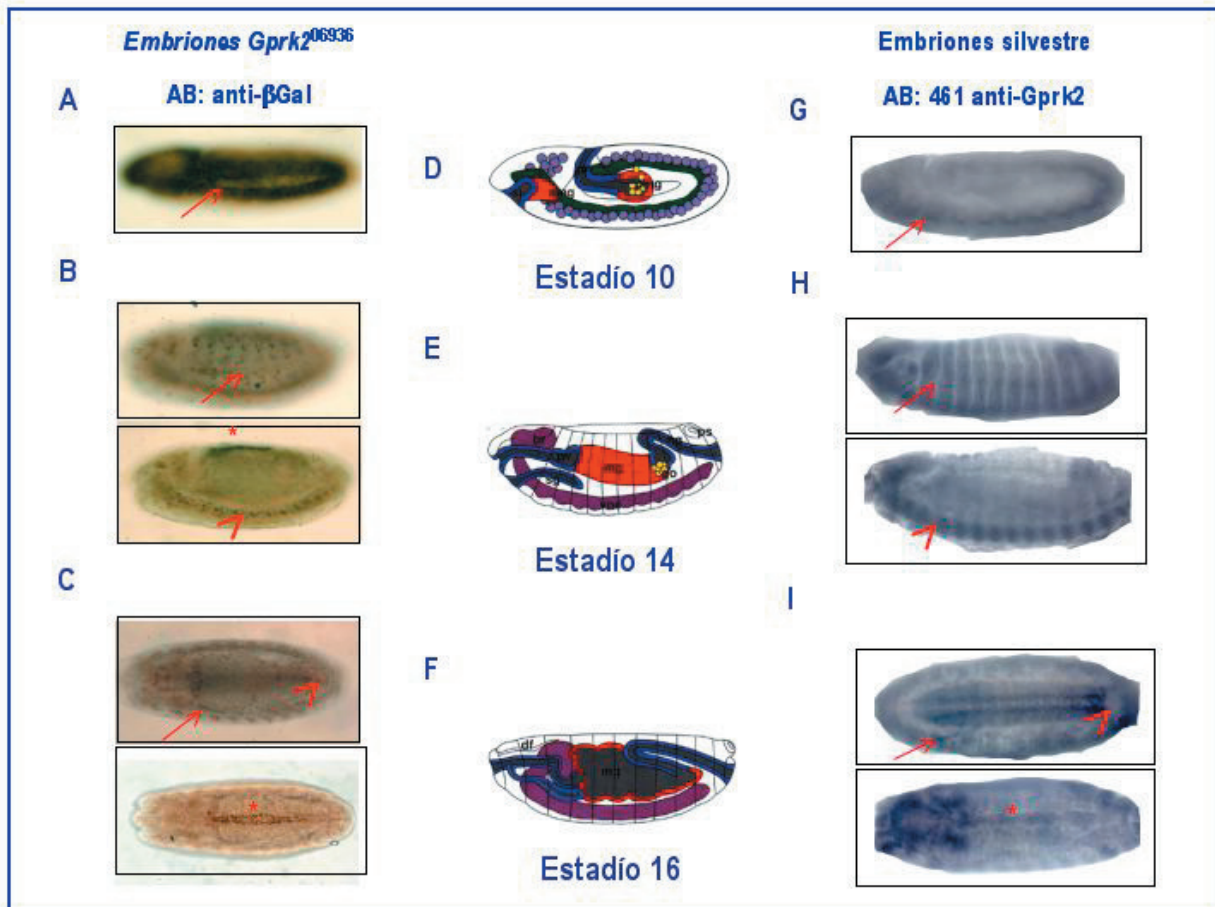
Estos anticuerpos se utilizaron también, en colaboración con el laboratorio del Dr. José Félix De Celis, en experimentos de inmunohistoquímica en el disco imaginal de ala de *D. melanogaster*. Los marcajes con los anticuerpos generados frente a la proteína de fusión Nt (sueros 460 y 461) muestran un patrón de expresión de Gprk2 que, aunque ubicuo y citosólico, es similar al patrón de expresión del gen *Gprk2*, observándose un aumento en los niveles de proteína en la región anterior al borde del compartimento A/P (**figura R 27A**). Además, utilizando un objetivo de mayor ampliación, hemos podido corroborar la presencia de Gprk2 en la membrana plasmática de las células del disco de ala (**figuras R 27B y B'**).



### FIGURA R 27.- PATRÓN DE EXPRESIÓN DE Gprk2 EN DISCOS DE ALA DE DROSOPHILA.

A) Inmunohistoquímica de disco imaginales de ala del tercer estadio larvario, utilizando una dilución 1:100 del anticuerpo 460 de Gprk2 (15.3.2 de MyM). Se observa marcaje generalizado en todo el disco del ala pero con un nivel mayor de expresión en el borde A/P (señalado con una flecha).

B,B') Expresión de *Gprk2* (rojo) en disco imaginal de ala de genotipo *Gal4-638/UAS-Gprk2* utilizando el anticuerpo 460 (1:100). Se presentan dos planos del epitelio (B apical y B' baso-lateral) para observar la localización en la membrana plasmática de Gprk2 en condiciones de sobre-expresión, como ocurre en las células S2 (**fig. R 26A**).



**FIGURA R 28.- PATRÓN DE EXPRESIÓN EMBRIONARIA DE GPRK2 EN DROSOPHILA.**

(A-C) embriones de la línea *Gprk2*<sup>06936</sup> teñidos con un anticuerpo anti- $\beta$ -gal y (G-I) embriones de tipo silvestre teñidos con anti-Gprk2 (anticuerpo AB461, dil 1:500), mostrando el patrón de expresión embrionaria de *Gprk2*. En estadio 10, *Gprk2* se detecta en el mesodermo (flechas en A y G). En estadio 14, se expresa en el mesodermo (flechas en B y H), en el sistema nervioso central (SNC) (cabezas de flecha en B y H) y a bajos niveles en la amnioserosa (asterisco en B). En estadio 16, *Gprk2* se sigue expresando en derivados mesodérmicos, como musculatura somática (flechas en C y I) y corazón (asteriscos en C y I), y en el SNC (puntas de flecha en C y I). D-F esquemas representativos de los estadios de desarrollo mostrados en A-C y G-I. A, B, G y H corresponden a vistas laterales de los embriones, C a vista media (panel superior) y dorsal (panel inferior) y I a vista ventral (panel superior) y dorsal (panel inferior).

Finalmente, para confirmar la capacidad de reconocer la proteína endógena, y para visualizar su patrón de expresión durante el desarrollo embrionario, se realizó, en colaboración con la Dra. Mar Ruiz Gómez del CBMSO, la tinción de embriones de *D. melanogaster* con el anticuerpo 461 (**figura R 28G, H y I**) y se comparó con el patrón de expresión del gen obtenido previamente en embriones portadores de una inserción P-lacZ (*Gprk2*<sup>06936</sup>), que se localiza en la región 5' no traducida del gen y que permite visualizar la expresión del gen *Gprk2* mediante tinciones contra la proteína  $\beta$ -gal (**figura R 28A, B y C**).

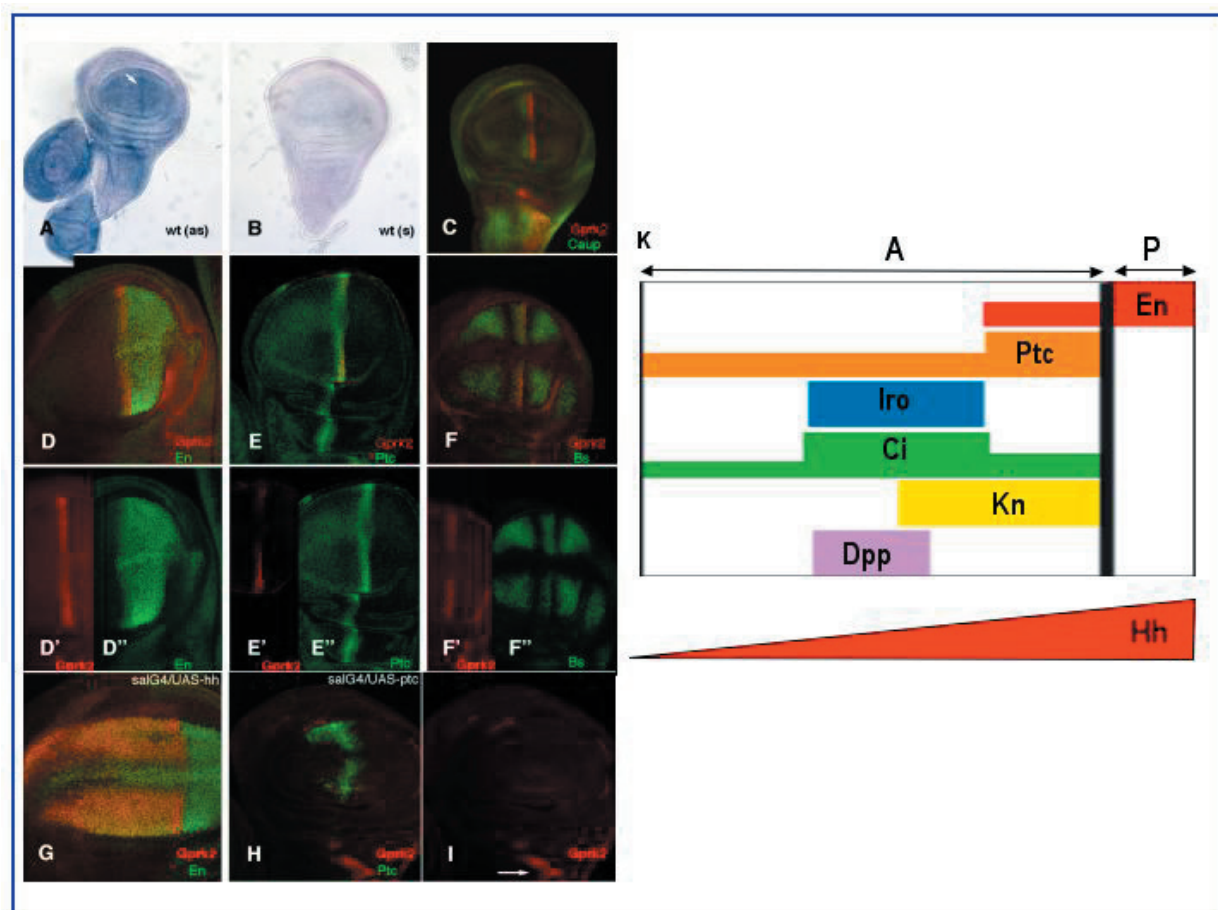
Ambos marcajes nos muestran que *Gprk2* se expresa desde estadios tempranos (**figura R 28D, E, F**), presentando una expresión ubicua, con niveles de expresión más elevados en el mesodermo (**figura R 28G**), tal y como se aprecia en tinciones de  $\beta$ -gal en los embriones *Gprk2*<sup>06936</sup> heterocigóticos (**figura R 28A**). En estadios posteriores (13-14; **figura 28E**), se observa una mayor expresión en el sistema nervioso central (SCN) y en el mesodermo somático, que originará los músculos en estadios más avanzados, comenzando a verse expresión en el cerebro (**figura R 28H**). Similares resultados se obtienen en el estadio 14 en embriones *Gprk2*<sup>06936</sup> (**figura R**



## RESULTADOS

28B). Por último, en el estadio 16 (figura R 28F), tanto con el anticuerpo frente a *Gprk2* como con el marcaje de  $\beta$ -gal, se observa la tinción del SNC, un marcaje del músculo y el corazón (figura R 28I, C).

### 3.2.- Regulación de la expresión de *Gprk2* por la señal de Hh en el disco de ala.



**FIGURA R 29.- AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DE GPRK2 EN REGIONES DE ALTOS NIVELES DE SEÑAL HH EN EL DISCO IMAGINAL DE ALA.**

A y B) Hibridación “in situ” en disco imaginal de ala de tercer estadio larvario utilizando sondas antisentido (as) (A) y sentido (s) (B) de *Gprk2*. Las tinciones se realizaron como se detalla en el apartado 2.10 de MyM. Aunque se aprecia una expresión ubicua de *Gprk2* en todo el disco imaginal del ala, los niveles más altos de expresión se detectan en la región del ala anterior al borde del compartimento anterior/posterior (A/P), señalado con una flecha blanca en A).

C-F) Expresión en discos imaginales de ala de tercer estadio larvario heterocigotos para la inserción *P-lacZ PZ-Gprk2*<sup>[06936]</sup> donde se presenta la localización de  $\beta$ -gal (rojo) (debida a la inserción de un elemento P-Lac Z en el promotor de *Gprk2*) y *caupolican* (*caup*, verde en C), *engrailed* (*En*, verde en D), *Patched* (*ptc*, verde en E) y *Blistered* (*Bs*, verde en F). En todos los casos se confirma que la expresión de  $\beta$ -gal se localiza en células situadas en el compartimento anterior entre las venas presumptivas L3 y L4. Los canales individuales de los discos mostrados en D, E y F se representan debajo con superíndices (') (canal rojo  $\beta$ -gal) y (') (canal verde, correspondiente a *En* en D', *Patch* en E' y *Bs* en F').

G) Expresión de  $\beta$ -gal (*Gprk2*, rojo) y *Engrailed* (*En*, verde) en discos imaginales de ala de tercer estadio de genotipo *sal-Gal4/+; PZ-Gprk2*<sup>[06936]</sup>/*UAS-hh*. En estos discos el gen *hh* se expresa ectópicamente en el compartimento anterior, activando su ruta de señalización y la expresión de *Gprk2* en estas células. La línea blanca señala el dominio expandido de expresión de  $\beta$ -gal y *En* en el compartimento anterior, apareciendo como naranja por la mezcla de las dos canales.

H-I) Expresión de  $\beta$ -gal (*Gprk2*, rojo) y *Patched* (*Ptc*, verde) en disco imaginales de ala de tercer estadio de genotipo *sal-Gal4/+; UAS-Ptc; PZ-Gprk2*<sup>[06936]</sup>/*+*. En estos discos el gen *ptc* se sobre-expresa en células anteriores (marcadas por tinción contra *Ptc*, en verde) y la expresión del gen reportero *lacZ* se elimina debido a la falta de función en la ruta Hh. El canal rojo del disco mostrado en H se presenta en I, donde se aprecia que la expresión de  $\beta$ -gal (*Gprk2*) en el tórax (donde no hay expresión de *sal-Gal4*) no está afectada (flecha blanca).

J) Esquema representativo de los niveles de expresión a ambos lados del borde A/P (barra negra gruesa) de los genes diana de Hh utilizados en la localización del dominio de expresión de *Gprk2*.

Estudios de hibridación *in situ* en discos de ala de tercer estadio larvario utilizando sondas *Gprk2* antisentido (**figura 29A**) y sentido (**figura 29B**) muestran que la expresión del mRNA de *Gprk2* es generalizada en todo el disco imaginal de ala, pero aparece aumentada en una línea próxima al borde del compartimento anterior-posterior (A/P) (flecha blanca, **figura R 29A**). Para profundizar en el análisis del patrón de expresión, se utilizó también la inserción *Gprk2*<sup>06936</sup> *P-lacZ*, en la que un elemento trasponible que contiene la zona codificante del gen *lacZ* se encuentra insertado cerca del extremo 5' del gen *Gprk2*.

En la figura **R 29C-F** se muestra la expresión de  $\beta$ -gal (rojo) junto con marcadores específicos de región tales como Engrailed (En), Patched (Ptc), Blistered (Bs) y Capoulican (Caup) (verde) (**figura R 29K**) en discos imaginales de ala en el tercer estadio. El análisis de estos resultados nos permitió concluir que la línea de máxima expresión de *Gprk2* se localiza en las células anteriores del borde A/P, donde se observa claramente la co-localización con Ptc. Estas células son las que se localizan más cercanas a la fuente de proteína Hh (el compartimento posterior), y por tanto en ellas los niveles de señalización de esta ruta son altos.

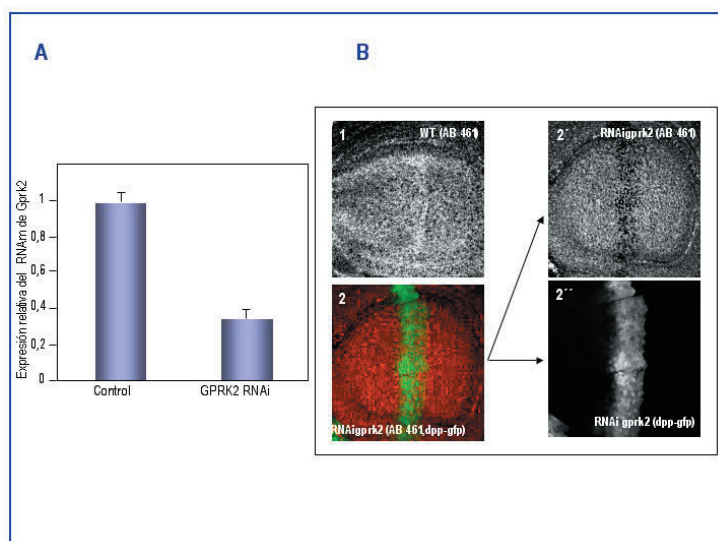
Para establecer la relación entre la expresión de *Gprk2* y la señalización por Hh, se generaron discos imaginales de ala que expresaban Hh de forma ectópica (*sal-Gal4/UAS-hh*) (**figura R 29G**), observándose que la expresión de  $\beta$ -gal (rojo) se expande a todo el compartimento anterior donde se sobre-expresaba Hh. Por el contrario, cuando la actividad de la ruta se reducía por la expresión ectópica de Ptc (*sal-Gal4/UAS-ptc*), la expresión de  $\beta$ -gal (rojo) desaparece (**figura 29H e I**). Estos resultados indican que la actividad de Hh regula la expresión de los altos niveles de *Gprk2* en la células anteriores al borde A/P.

### 3.3.- Estudios de RNA interferente para *Gprk2* revelan que la quinasa es necesaria en la ruta de señalización de Hh en el disco imaginal de ala.

Para comenzar a caracterizar el papel de *Gprk2* en el disco imaginal de ala procedimos a la generación de una línea transgénica de *Drosophila melanogaster* que expresase un RNA interferente (RNAi) dirigido contra *Gprk2* bajo el control del promotor UAS, de tal manera que fuese posible silenciar la expresión del gen de forma dirigida y específica (ver apartado 2.11.2 de MyM) (trabajo realizado en colaboración con el laboratorio del Dr. José Félix de Celis). Para ello tuvimos, previamente, que llevar a cabo el diseño y la generación del RNAi de *Gprk2* (ver detalles en el apartado 2.11.2 de MyM). En primer lugar, seleccionamos una zona de unos 500 pb del cDNA de *Gprk2*, sin homología con ningún otro gen de *Drosophila*. A continuación, clonamos dos secuencias invertidas del fragmento seleccionado flanqueando el intrón 2 de *white* en el vector pUAS*t*, e inyectamos el vector pUAS*t*-*Gprk2i* recombinante, junto con el plásmido Helper, que codifica el enzima que posibilita la inserción de los elementos P en el DNA genómico, en la parte posterior de embriones de mosca en fase temprana del desarrollo (Lee, 2003). Utilizando procedimientos estándar de genética de *Drosophila*, seleccionamos diferentes líneas transgénicas con inserciones de la construcción pUAS*t*-*Gprk2i*. Mediante combinaciones genéticas, y utilizando el sistema Gal4/UAS (Brand, 1993), dirigimos la expresión del RNAi en el disco imaginal de ala en individuos *Gal4-638/UAS-Gprk2i* (ver figura 7 de MyM).

Para comprobar que el RNA interferente generado estaba reduciendo los niveles de mRNA de *Gprk2* se realizaron ensayos de PCR cuantitativa. Los resultados mostraron una reducción de los niveles de mRNA en los discos imaginales *Gal4-638/UAS-Gprk2i* de un  $66 \pm 1,5$  %, como se muestra en la **figura R 30A**. La disminución de la expresión de *Gprk2* también se observó al comparar, mediante inmunofluorescencia, discos imaginales de ala de moscas salvajes y moscas *Gal4-638/UAS-Gprk2i* (**figura R 30B**).

## RESULTADOS



**FIGURA R 30.- REDUCCIÓN DE LOS NIVELES DE mRNA EN LOS DISCOS DE ALA *Gal4-638/UAS-Gprk2i*.**

A) Análisis por PCR cuantitativa de los niveles de expresión de *Gprk2* en presencia del RNAinterferente dirigido contra este transcrito. El RNA total se obtuvo a partir de 30 discos imaginales salvajes (control) y 30 discos imaginales de genotipo *Gal4-638/UAS-Gprk2i* por el método de TRIZOL (Invitrogen), siguiendo el procedimiento recomendado por la casa comercial, como se describe en el apartado 2.6 de MyM. Para la RT-PCR se utilizaron 0,7 µg de RNA y se realizó según se describe en el apartado 2.7 de MyM. El análisis por PCR cuantitativa se realizó en un ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) utilizando la prueba TaqMan

de Applied Hs99999901\_s1 para la subunidad 18S del rRNA y la prueba TaqMan UP nº 61 de la Universal Probe Library (Roche, Indianápolis, IN) para *Gprk2* y 20 ng del cDNA correspondiente. La cuantificación de la reducción de mRNA se realizó con el método DDCT en el SIDI.

B) Expresión en discos imaginales de ala de tercer estadio larvario de *Gprk2* de genotipo silvestre (1; anticuerpo 461 usado 1:100) y de genotipo *Gal4-dpp/UAS-Gprk2i; UAS-GFP/+* (2; anticuerpo 461). En verde en 2, y como canal separado en 2'', se representa la expresión de GFP, que se corresponde con el dominio en el que se reduce la cantidad de *Gprk2* (rojo en 2).

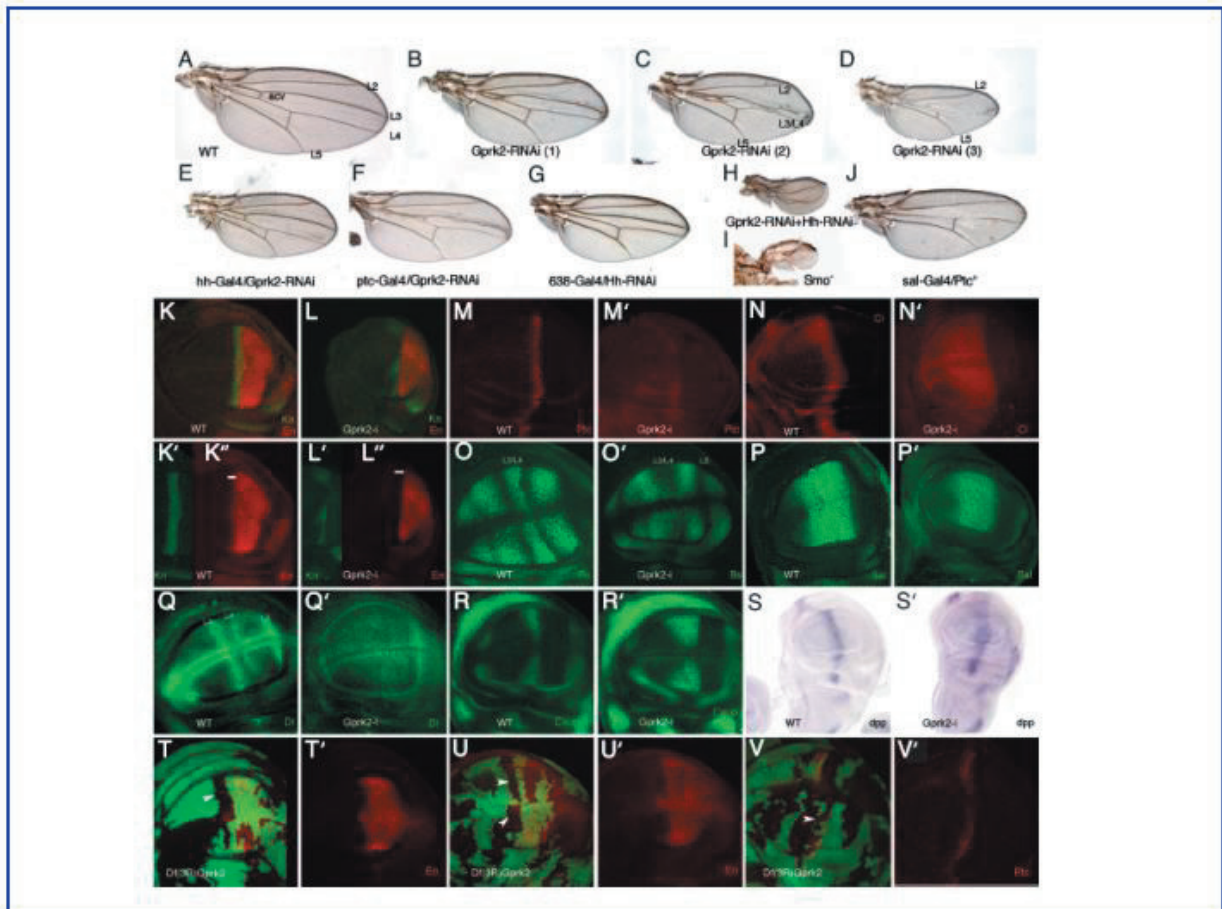
En la combinación *Gal4-638/UAS-Gprk2i* observamos una reducción variable del tamaño de la intervena L3/L4, que en algunos casos va acompañada por la falta de estas venas (**figura R 31D**). Estas venas y la intervena L3/L4 corresponden al territorio especificado por la señalización de Hh (Crozatier, 2002).

De esta manera, el fenotipo del ala obtenida por la reducción de los niveles de *Gprk2* es muy similar al resultante de reducir moderadamente la señal de Hh, bien por expresión ectópica de Ptc (**figura 31J**) o bien por expresión del RNAi de Hh (**figura 31G**). Estos datos parecen estar implicando a *Gprk2* en la ruta de Hh.

Para estudiar el posible papel de *Gprk2* en la regulación de la vía Hh y con objeto de distinguir el efecto de la reducción de los niveles de *Gprk2* en las células que producen o responden a Hh, se utilizaron líneas *Gal4* que se expresan sólo en el compartimento anterior (*Gal4-Ci* y *Gal4-Ptc*) o en el compartimento posterior (*Gal4-hh*), y no en el territorio completo del ala como ocurre con la línea *Gal4-638*, anteriormente presentada. Las **figuras R 31E y 31F** muestran que la reducción de la intervena L3/L4 (fenotipo Hh) sólo tiene lugar cuando la reducción de los niveles de *Gprk2* se produce en el compartimento anterior (**figura R 31F**) y no en el posterior (**figura R 31E**).

Estos datos nuevamente apuntan a un papel de *Gprk2* en esta ruta y se ven reforzados al comprobar que el fenotipo resultante de reducir la expresión de *Gprk2* en discos de ala con niveles bajos de Hh (*Gal4-638/+; UAS-hhi / UAS-Gprk2i*, **figura 31H**), es la práctica desaparición del ala. Como se observa en la **figura R 31I**, este fenotipo es similar al obtenido por la falta del receptor de siete dominios transmembrana Smo. En su conjunto, estos resultados nos están indicando que la función de *Gprk2* parece ser necesaria para la transducción de la señal de Hh. En este sentido *Gprk2* estaría activando la ruta y no actuando, como se ha descrito para otros GPCRs, promoviendo la terminación de la señal (Reiter, 2006).





**FIGURA R 31.- Gprk2 ES NECESARIA PARA LA ACTIVACIÓN DE LA RUTA Hh.**

A) Fotografía de un ala de mosca salvaje (wt) donde se señala la posición de las venas longitudinales desde la L2 a la L5.

B-D) Fenotipos generados por la expresión ectópica del RNA interferente de Gprk2 en moscas de genotipo *Gal4-638/UAS-Gprk2i*. El rango de fenotipos presentados abarca desde fenotipos débiles, caracterizados por una reducción moderada del tamaño del ala y por una disminución en la distancia entre las venas L4 y L5 [B; *Gprk2-RNAi* (1)]; fenotipos moderados, caracterizados por la fusión parcial de las venas L3 y L4 [C; *Gprk2-RNAi* (2)]; y por último, fenotipos fuertes donde se observa una disminución grande del tamaño del ala y la ausencia de las venas L3 y L4 [D; *Gprk2i* (3)].

(E) Ala de moscas de genotipo *Gal4-hh/UAS-Gprk2i*, que sobre-expresan el RNA interferente de Gprk2 en el compartimento posterior.

F) Ala de moscas de genotipo *Gal4-ptc/UAS-Gprk2i*, que sobre-expresan el RNA interferente de Gprk2 en células anteriores próximas al borde A/P.

G) Ala de mosca de genotipo *638-Gal4/UAS-hhi*, que sobre-expresan el RNA interferente de *hh* en toda el ala y que se caracterizan por una reducción del tamaño del ala, la disminución en la distancia entre las venas L3 y L4 y la pérdida de la crossvena anterior (acv) en A.

H) Ala de mosca *638-Gal4/UAS-hhi; UAS-Gprk2i/+*, que sobre-expresan los RNAi de *hh* y *Gprk2* en toda el ala y que presenta un fenotipo fuerte de falta de función de hh. Comparar con el efecto de la sobre-expresión del RNA interferente sólo de hh-RNAi (G) o sólo de *Gprk2-RNAi* (B-D).

I) Ala de moscas de genotipo *Gal4-638/+; FRT42 smo2/FRT42M(2)I2; UAS-FLP/+*, con fenotipo severo de falta de función de Hh. Estas alas están formadas por células homocigóticas *smo2* y presentan un tamaño reducido y la pérdida de todos los elementos de patrón del ala.

J) Ala de moscas de genotipo *sal-Gal4/UAS-ptc*, con fenotipo de falta de función de Hh debido a la expresión ectópica de *ptc*, presentan un fenotipo muy similar a la falta de función de *Gprk2* (comparar con D).

K-K'') Inmunohistoquímica de discos imaginales de ala salvajes de tercer estadio larvario. Se presenta la expresión de Knot (Kn; K y K', en verde) y Engrailed (En; K y K'', en rojo)

L-L'') Inmunohistoquímica de disco imaginales de ala de tercer estadio larvario de genotipo *Gal4-638/UAS-Gprk2*. Se observa

## RESULTADOS

la expresión reducida de Knot (Kn; L y L', en verde) y la pérdida de la expresión de Engrailed en el compartimento anterior (En; L y L'', en rojo) debido a la pérdida de función de Gprk2. Las líneas blancas en K'' y L'' delimitan el dominio de expresión de En en el compartimento anterior.

M y M') Inmunohistoquímica de la expresión de Ptc en discos imaginales de ala salvajes de tercer estadio larvario (wt, M) y de genotipo *Gal4-638/UAS-Gprk2* (Gprk2-i, M'). La falta de Gprk2 reduce la expresión de Ptc (M' comparado con M).

N y N') Inmunohistoquímica de la expresión de Ci en discos imaginales de ala salvajes (wt, N) y *Gal4-638/UAS-Gprk2* (Gprk2-i, N') de tercer estadio larvario. La falta de Gprk2 reduce la expresión de Ci (N' comparado con N).

O y O') Inmunohistoquímica de la expresión de Bs en discos imaginales de ala salvajes (wt, O) y *Gal4-638/UAS-Gprk2* (Gprk2-i, O') de tercer estadio larvario. La falta de Gprk2 elimina el dominio de expresión de Bs en la intervena L3/L4.

P y P') Inmunohistoquímica de la expresión de Sal, gen diana de Dpp, en discos imaginales de ala salvajes (wt, N) y *Gal4-638/UAS-Gprk2* (Gprk2-i, N') de tercer estadio larvario. La falta de Gprk2 no afecta el nivel expresión de Sal ni la extensión en el eje anterior/posterior de este dominio.

Q y Q') Inmunohistoquímica de la expresión de DI en discos imaginales de ala salvajes (wt, Q) y *Gal4-638/UAS-Gprk2* (Gprk2-i, Q') de tercer estadio larvario. La falta de Gprk2 reduce la expresión de DI en las venas L3 y L4.

R y R') Inmunohistoquímica de la expresión de Caupolican (Caup) en discos imaginales de ala salvajes (wt, R) y *Gal4-638/UAS-Gprk2* (Gprk2-i, R') de tercer estadio larvario. La falta de Gprk2 expande la expresión de Caup, una diana de los niveles de baja señalización de Hh, hacia el borde del compartimento A/P, posiblemente debido a la falta del represor En.

S y S') Hibridación *in situ* con una sonda antisentido dpp en discos imaginales de ala salvajes (wt, S) y *Gal4-638/UAS-Gprk2* (Gprk2-i, S') de tercer estadio larvario. La reducción de la expresión de *Gprk2* lleva a una menor expresión de dpp pero en un dominio más amplio.

T-V) Clones de células *Df(3R)Gprk2* inducidas en discos de ala de genotipo *hs-FLP1.22; FRT82 Df(3R)Gprk2/ FRP82 M (3)w Ubi-GFP* a las 48-72 h después de la puesta del huevo. Las células homocigotas para *Gprk2*<sup>-/-</sup> carecen de la expresión de GFP y aparecen como manchas negras. La expresión de En (En, en rojo) se muestra en T y T', U y U' y la expresión de Ptc (Ptc, en rojo) en V y V'. En células mutantes para *Gprk2* localizadas en el compartimento anterior cerca del borde A/P no se observa expresión ni de En (T-U') ni de Ptc (V y V'). T', U' y V' son los canales rojos de T, U y V, respectivamente.

### 3.4.- Gprk2 es necesaria para la expresión de genes que dependen de Hh en el disco imaginal de ala.

En el disco imaginal de ala, Hh se expresa en las células del compartimento posterior (Vervoort, 2000) y difunde a las células del compartimento anterior adyacentes (Podós, 1999), sobre las que actúa induciendo la expresión génica. El gradiente de Hh que se establece determina la expresión selectiva de distintos genes diana, ya que niveles altos de Hh inducen la expresión de En, Ptc o Bs y niveles bajos la de Knot, Iro y dpp. Para caracterizar el efecto de la reducción de Gprk2 sobre la ruta de Hh estudiamos la expresión de genes diana de la ruta en discos imaginales de ala de genotipo *Gal4-638/UAS-Gprk2i* (**figura R 31K-S**). Si comparamos la distribución de En y Ptc, genes que responden a altos niveles de Hh, en los discos *Gal4-638/UAS-Gprk2i* (**figuras R 31L, L' y M'**) con su expresión normal (**figuras R 31K, K'' y M**) observamos que la reducción de Gprk2 conlleva la desaparición de En y Ptc en las células del compartimento anterior. La expresión de Knot (Kn) también se reduce en los discos *Gal4-638/UAS-Gprk2i* (**figuras R 31K' y L'**), mientras que la línea de máxima acumulación de Ci, gen que responde a bajos niveles de Hh, se expande (**figuras 31N y N'**).

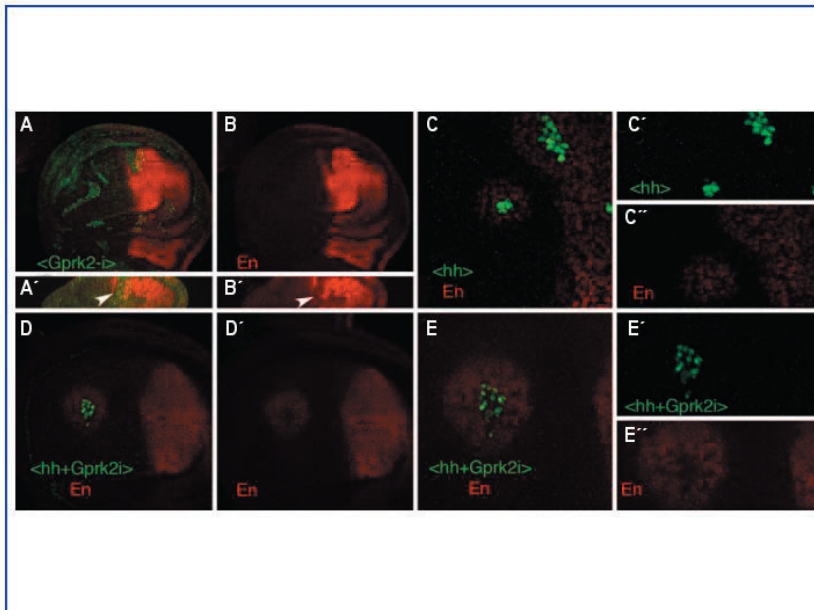
Para confirmar que Gprk2 se requiere sólo en la recepción de Hh y no en su secreción, analizamos la expresión de Engrailed en clones de células que expresaban ectópicamente Gprk2i, Hh o simultáneamente Gprk2i y Hh. En la **figura R 32** se puede observar que en los clones que expresan Gprk2i localizados en el compartimento anterior, región de expresión de En, la expresión de éste desaparece (**figura R 32A-A', B-B'**). Por otro lado, se observa que en clones que expresan Hh ectópicamente, la expresión de En se induce no sólo dentro del clon sino también en las células del entorno (**figura R 32C-C'**), pues Hh se secreta actuando sobre las células circundantes. En los clones de células que expresan tanto Gprk2i como Hh (**figura 32D-D', E-E'**), la expresión de En no se localiza dentro del clon, donde las células expresan Gprk2i, pero si fuera de él, donde se recibe Hh y los niveles de la quinasa no están alterados. Estos resultados indican que Gprk2 es necesaria en las células que reciben la señal de Hh y no se requiere para su secreción.

**FIGURA R 32.- LA FUNCIÓN DE Gprk2 SE REQUIERE DESPUÉS DE LA UNIÓN DEL LIGANDO (HH) AL RECEPTOR (PTC).**

A y B) Expresión de Engrailed (En, rojo) en disco imaginal de ala portador de clones de células que expresan Gprk2i (marcados en verde, A) inducidos en larvas de genotipo *hs-FLP; Ubx/abx Gal4-lacZ/UAS-Gprk2i*. B, se corresponde al canal rojo de A. La expresión de En desaparece en las células del compartimento anterior. En A' y B' se muestran las secciones Z de los discos mostrados en A y B, respectivamente.

C) Expresión de Engrailed (En, rojo) en discos imaginales de ala que presentan clones de células que expresan Hh (<hh>, verde) inducidos en larvas de genotipo *hs-FLP; Ubx/abx Gal4-lacZ/UAS-hh*. La expresión de En se activa en las células anteriores tanto dentro de los clones que expresan Hh como en las células salvajes que los rodean. Los canales individuales muestran En (rojo, C'') y los clones de células que expresan Hh (verde, C').

D-E) Expresión de Engrailed (En, rojo) en discos imaginales de ala que presentan clones de células que expresan Gprk2i y Hh (<hh+Gprk2i>, verde). La expresión de En se activa en las células anteriores que rodean a los clones pero no dentro de los mismos clones (deficientes para *Gprk2*). Los canales individuales muestran En (rojo, D' y E') y las células que expresan Gprk2i y Hh (verde, E'). E-E'' Ampliación del clon mostrado en D.



Para determinar qué aspecto de la señalización de Hh está afectado por la falta de Gprk2 analizamos, en discos *Gal4-638/UAS-Gprk2i*, la expresión de genes regulados por niveles bajos de la ruta de señalización de Hh (*caupolican*, *caup*, y *decapentaplegic*, *dpp*). El dominio de expresión de Caup y de Dpp se expande hacia el borde A/P en los discos *Gal4-638/UAS-Gprk2i* (figuras 31R' y 31S', comparar con figuras 31R y 31S). Este resultado es el esperado debido a la falta de Ptc en estas células y sugiere que la disminución de los niveles de la quinasa reduce de forma significativa la señalización que depende de altos niveles de Hh y de forma muy poco eficiente la señalización por niveles bajos de Hh.

**3.5.- Especificidad del RNA interferente de Gprk2: Generación de clones deficientes en la quinasa.**

Con objeto de confirmar la especificidad del RNA interferente de Gprk2, se generaron clones de células deficientes para la región codificante del gen (*Df(3R)Gprk2*) y se analizó el efecto de esta deficiencia sobre los genes diana de la ruta de Hh, *En* y *Ptc*. En los clones de células deficientes para *Gprk2*, localizados en la región anterior próximas al borde A/P, se eliminan la expresión de En (70% de 22 clones, figura R 31T-T', U-U') y *Ptc* (figura R 31 V y V'), de manera autónoma celular.

**3.6.- Expresión de la proteína Smoothed (Smo) en discos de ala mutantes para Gprk2.**

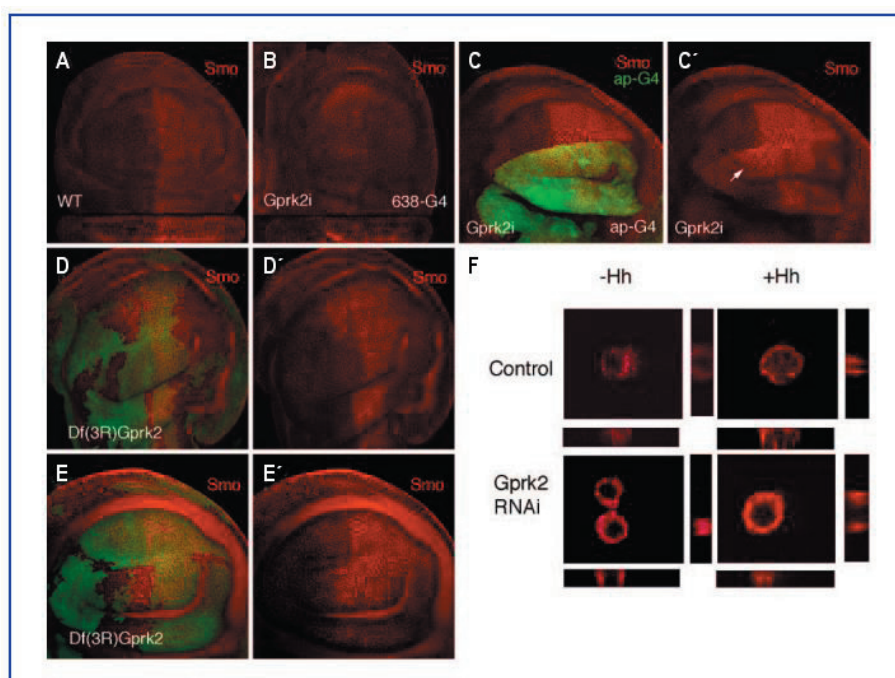
Los datos hasta ahora presentados parecen confirmar que Gprk2 actúa "por debajo" de la recepción del ligando. Como ya mencionamos en la introducción, recientemente se ha descrito que la proteína Smo de mamíferos es fosforilada por GRK2, una vez es activada la ruta por la unión del ligando. Esta fosforilación recluta  $\beta$ -arrestinas que inducen la internalización de Smo, permitiendo la propagación de la señal (Chen, 2004). En invertebrados, no



## RESULTADOS

se había descrito la participación de ningún homólogo de GRKs en la ruta de señalización de Hh. Según los datos bibliográficos, la activación de la ruta en *Drosophila* provocaba la internalización del complejo Hh/Ptc/Smo y, tras la ruptura del mismo, la fosforilación de Smo por PKA y CKI, favoreciendo su localización en la membrana (Lum, 2004; Kalderon, 2005; Kalderon, 2008) y la progresión de la señal. Sin embargo, nuestros resultados nos sugerían que Gprk2 podía estar ejerciendo algún efecto sobre Smo, pues la quinasa parecía estar actuando en la recepción de la señal.

Por este motivo, nos propusimos estudiar la expresión y localización subcelular de Smo en discos de ala donde la actividad de Gprk2 estuviese reducida.



**FIGURA R 33.- LA ACUMULACIÓN DE SMO DEPENDE DE LA ACTIVIDAD DE Gprk2.**

A y B) Expresión de Smo en discos imaginales de ala de larvas salvajes (WT, A) y 638-Gal4/UAS-Gprk2i (Gprk2i, B) visualizados con el anticuerpo anti-Smo de ratón (rojo). Bajo cada imagen se muestran los cortes Z correspondientes. C y C') Expresión de GFP (verde) y Smo (rojo) en disco imaginal de ala de genotipo ap-Gal4/UAS-Gprk2i UAS-GFP. Se produce la acumulación de Smo en un amplio rango de células dorsales del compartimento anterior (flecha blanca). D y E) Ejemplos de clones Df(3R)Gprk2 (marcados por la

ausencia de verde) que muestran un aumento de la expresión de Smo (rojo) en las células del compartimento anterior cercanas al borde A/P.

F) Células S2 control y tratadas con RNAi de Gprk2 durante 4 días (como se detalla en el apartado 3.8.4 de MyM) se sembraron en placas pretratadas con poli-lisina y se incubaron durante 6 horas con medio condicionado de células S2 o de células que expresan establemente el dominio amino-terminal de Hh (S2HhN). Las células se fijan con formaldehído al 3,7% y la detección de Smo se realiza utilizando el anticuerpo monoclonal de Smo y un anticuerpo secundario unido al fluoróforo Alexa-448 como se detalla en el apartado 15.3.1 de MyM.

En discos imaginales de ala de moscas salvajes, el RNA de Smo se expresa en todo el disco, pero la expresión de la proteína sólo se observa en las células del compartimento posterior y en aquellas células del compartimento anterior que están expuestas a Hh (Denef, 2000, ver **figura R 33A**). Sin embargo, cuando se analiza la expresión de Smo en los discos de ala 638-Gal4/UAS-Gprk2i (**figura R 33B**), que expresan Gprk2i en todo el ala, se observa que Smo ya no se distribuye de forma diferencial entre el compartimento anterior y posterior del ala, sino que se detectan niveles similares de expresión en ambos compartimentos (**figura R 33A y 33B**). Cuando los niveles de Gprk2 se reducen sólo en el compartimento dorsal (Gal4-ap/UAS-Gprk2i) (**figura R 33C-C'**), los cambios en la expresión de Smo son más evidentes, pues Smo se localiza en el compartimento posterior y en las células del compartimento anterior localizadas en la región dorsal, que es donde se reduce la expresión de Gprk2. En los clones de células Df(3R)Gprk2 (homocigóticas Gprk2<sup>-/-</sup>) (**figura R 33D-D' y E-E'**) se observa también

un aumento de la expresión de Smo en las células anteriores situadas próximas al borde A/P. La extensión de la expresión de Smo en las células anteriores puede ser debido a un aumento del rango de difusión de Hh ya que Ptc no está expresado en las células mutantes para Gprk2 (Chen, 1996).

El mismo resultado se observa cuando utilizamos células S2 (**figura R 33F**). En ausencia de Hh, Smo se localiza en vesículas intracelulares (**figura R 33F arriba/izquierda**). La activación de la ruta mediante el tratamiento de las células con el ligando Hh (**figura 33F arriba/derecha**), induce la localización de Smo en la membrana. Sin embargo, en células que han sido tratadas 4 días con el RNAs de *Gprk2* (reducción de los niveles de Gprk2 en un  $77 \pm 1,5$  %), Smo no se encuentra internalizado en vesículas, independientemente de que las células sean tratadas o no con Hh (**figura 33F abajo/izquierda y derecha**).

Por tanto, estos datos parecen estar indicando una relación funcional entre la proteína Smo y la quinasa Gprk2, que podría estar afectando, por un lado, a la activación de la ruta y, por otro, a la estabilidad de la proteína. Por tanto, sería interesante determinar si la quinasa está implicada en la internalización, cambio de localización y/o vida media de la proteína Smo, como se comentará en profundidad en la discusión de esta memoria.

### 3.7.- Relación funcional entre Smo y Gprk2.

Con objeto de analizar esta relacional funcional existente entre Smo y Gprk2, se expresaron, en un mismo disco de ala, Gprk2i con distintos mutantes de Smo (delección N-terminal (Smo $\Delta$ N), delección C-terminal (Smo $\Delta$ C)) (Nakano, 2004) (**figura R 34**).

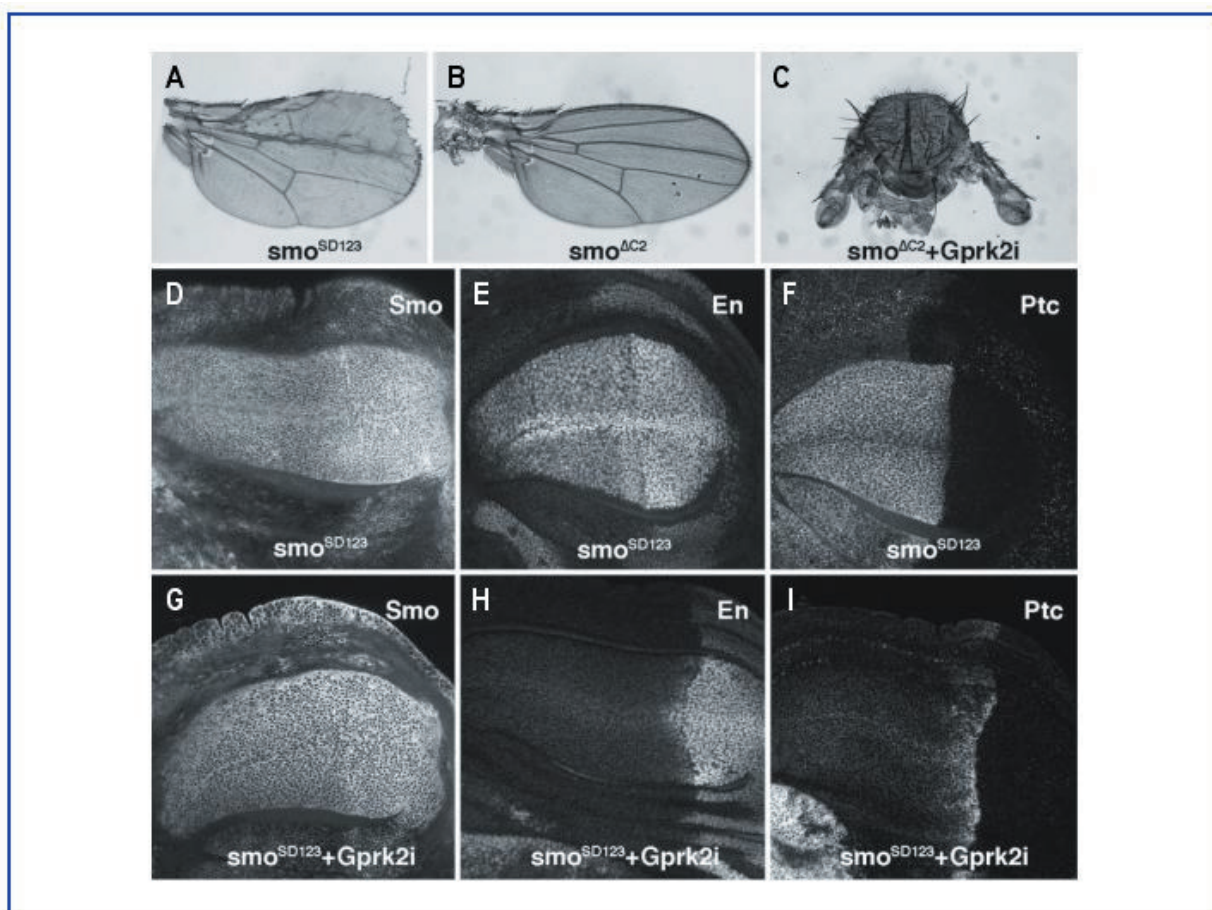
Como se observa en la **figura R 34B**, la sobre-expresión de los mutantes deficientes en el extremo carboxilo terminal de Smo no interfieren significativamente en la señal de Hh, pero la co-expresión del mutante deficiente del extremo carboxilo-terminal Smo $\Delta$ C, unido a bajos niveles de la quinasa por expresión de Gprk2i, genera un fenotipo fuerte de pérdida de función de la ruta Hh (**figura R 34C**). De hecho, este fenotipo es equivalente al observado cuando se elimina completamente Smo (**figura R 31I**). Por tanto, la reducción de Gprk2 revela un efecto dominante negativo de la proteína Smo $\Delta$ C, que conduce a una falta mayor de señalización. Una posibilidad es que, para ser correctamente activado, Smo forme complejos, y que la falta del dominio C-terminal o la falta de su fosforilación por Gprk2, lleve a la formación de complejos inactivos que secuestren a las proteínas Smo endógenas.

La función de Gprk2 podría ser, por tanto, la de fosforilar la cola citoplasmática de Smo, promoviendo la interacción de Smo con el complejo Costal2/Fused/SuFu para así impedir el procesamiento de Ci en su forma represora y permitir la transcripción de los genes diana de la ruta. También, y en consonancia con lo descrito para vertebrados (Chen, 2004), es posible que Gprk2 actúe en el reciclaje de Smo desde la membrana citoplasmática a un compartimento de señalización intracelular, mediante su fosforilación y reclutamiento de  $\beta$ -arrestina.

Los resultados obtenidos con el mutante de delección C-terminal de Smo (Smo $\Delta$ C) implican a este dominio en la relación funcional con Gprk2. En esta región de Smo es donde se han localizado los sitios de fosforilación de las Ser/Thr quinasas descritas hasta la fecha como reguladoras de la actividad de Smo, como PKA o CKI (Jia, 2004), así como fosfo-residuos que han sido detectados en su forma fosforilada (Apionishev, 2005; Zhang, 2004), de los que se desconoce la quinasa responsable y que serían sitios candidatos a ser fosforilados por GRKs (Ruiz-Gómez, 2007).

## RESULTADOS

Como hasta la fecha sólo se había descrito la fosforilación de Smo por PKA y CKI en *Drosophila*, nos pareció interesante estudiar el efecto de la falta de función de Gprk2 sobre mutantes de Smo que mimetizan su fosforilación por PKA y CKI (Smo<sup>SD123</sup>, Jia, 2004). Como puede verse, y en línea con lo descrito para la mutación, la expresión de Smo<sup>SD123</sup> en el disco de ala causa un sobre-crecimiento del compartimento anterior así como defectos en las venas L2 y L3 (figura R 34A).



**FIGURA R 34.- INTERACCIÓN ENTRE Gprk2 Y LOS DOMINIOS INTRACELULARES DE SMO.**

A) Fenotipo causado por la expresión de la forma que mimetiza el estado constitutivamente fosforilado de Smo (Smo<sup>SD123</sup>) en el ala en individuos 638-Gal4/UAS-smo<sup>SD123</sup>.

B y C) Fenotipo causado por la expresión ectópica de una delección del extremo carboxilo terminal de Smo (638-Gal4/UAS-Smo<sup>ΔC2</sup>, B) y fenotipo severo debido a la falta de señalización de Hh resultante de la co-expresión del RNAi de Gprk2 en el fondo genético del mutante de delección de Smo (638-Gal4/UAS-Smo<sup>ΔC2</sup>+UAS-Gprk2i, C).

D-F) Expresión de Smo (D), En (E) y Ptc (F) en discos de ala de genotipo 638-Gal4/+; UAS-Smo<sup>SD123</sup>/. Se observa la expansión de los dominios de expresión de Smo, En y Ptc a todo el compartimento anterior.

G-I) Expresión de Smo (G), En (H) y Ptc (I) en discos de ala de genotipo 638-Gal4/+; UAS-Smo<sup>SD123</sup>/ UAS-Gprk2i. La expresión en el compartimento anterior de En (H) y Ptc (I) desaparece como consecuencia de la reducción de los niveles de Gprk2. A pesar de la presencia de la proteína Smo<sup>SD123</sup> en la membrana celular de las células anteriores (G), la ruta no es totalmente activa y por tanto no se produce la expresión de genes diana que requieren altos niveles de Hh como En y Ptc.

La inducción de la expresión de Smo<sup>SD123</sup> en todo el disco imaginal de ala (discos Gal-638/+UAS-Smo<sup>SD123</sup>/+genotype), hace que la expresión de los genes diana de la ruta (En y Ptc, figura R 34D-F) se expandan al compartimento anterior. Sin embargo, al reducir los niveles de Gprk2 en los discos de ala que expresan Smo<sup>SD123</sup>,

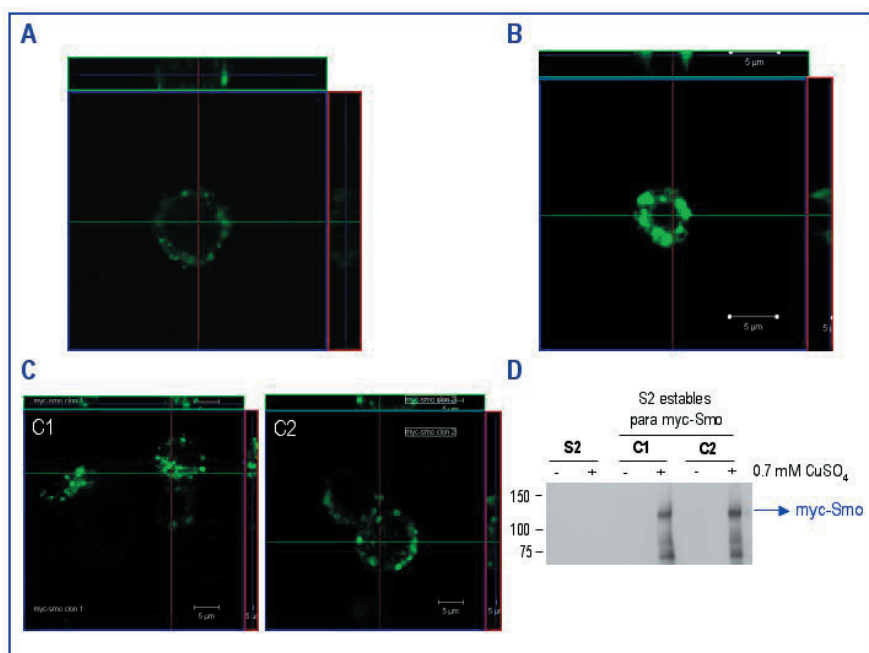


la acumulación de Smo se mantiene tanto en el compartimento posterior como en el anterior pero, sin embargo, la expresión de En y Ptc se restringe a su dominio normal, adyacente al borde A/P (**figura R 34G-I**). De estos datos se deduce que la activación constitutiva de Smo por PKA y CKI no es suficiente para inducir la expresión de los genes diana de la ruta, siendo necesario, además, que Gprk2 fosforile a Smo en su cola citoplasmática para que tenga lugar la transmisión de la señal.

### 3.8.- La expresión del cDNA de Gprk2 es capaz de rescatar el fenotipo inducido por Gprk2i.

Si los efectos por falta de función de Gprk2 observados hasta el momento son debidos exclusivamente a la deficiencia del gen *Gprk2*, es de esperar que la sobre-expresión del gen en el disco imaginal de ala 638-*Gal4/UAS-Gprk2i* pueda revertir el fenotipo. En este sentido, la Dra Cristina Molnar del laboratorio del Dr. José F. De Celis, ha visto como la expresión de pUAS-Gprk2 y no la de su mutante inactivo pUAS-Gprk2<sub>K338R</sub> revierte el fenotipo de moscas deficientes para el gen *Gprk2*.

### 3.9.- Ruta de Hh/Smo en células S2.



**FIGURA R 35.- LOCALIZACIÓN CELULAR DE SMOOTHENED EN LAS LÍNEAS S2-myc-Smo ESTABLES GENERADAS.**

A y B) Células S2 se sembraron sobre cristales de 35mm, pre-tratados con poli-lisina (10 µg/ml), y se transfectaron transitoriamente con pUAS-GFP-Smo (A) y pUAS-myc-Smo (B) (ver apartado 3.3.1 de MyM), junto con Gal4-Actina, según se detalla en el apartado 3.4 de MyM. 48 horas después de la transfección, las células se fijaron con formaldehído al 3,7 % y se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol (apartado 15.3.1 de MyM). (A) Se muestra la imagen obtenida directamente con el microscopio

confocal LSM510 del Servicio de Microscopía Confocal, CBMSO. (B) Las células se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-myc (Hibridoma) (apartado 15.4 de MyM) a una dilución 1:500. Como fluoróforo se utilizó anti-ratón Alexa 488 (Invitrogen, dil. 1:500).

C) Células S2 estables para myc-Smo (apartado 3.2.1 de MyM), líneas C1 y C2, se sembraron sobre cristales de 35 mm, pre-tratados con poli-lisina. Al día siguiente, las células se trataron con 0,7 mM de CuSO<sub>4</sub> durante 24-36 horas en medio X-Press suplementado con FBS al 8% sin puomicina, para inducir la expresión de myc-Smo. 24 horas después, las células se fijaron y deshidrataron como en el caso anterior. Las células se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-myc (Hibridoma) (apartado 15.4 de MyM) a una dilución 1:500. Como fluoróforo se utilizó anti-ratón Alexa 488 (Invitrogen, dil. 1:500). En la figura se muestra la imagen obtenida con un microscopio confocal LSM510.

D) Líneas S2 estables para myc-Smo C1 y C2 tratadas con 0,7 mM de CuSO<sub>4</sub> durante 24-36 horas en medio X-Press suplementado con FBS al 8% sin puomicina. A día siguiente, las células fueron tratadas o no con medio condicionado Hh (apartado 3.2.2 de MyM) durante 4 horas y, posteriormente, se lisaron en tampón de lisis (10mM Tris, 2mM EDTA). Los lisados celulares se resolvieron en un gel SDS-poliacrilamida del 8%. La expresión de myc-Smo se detectó por inmunomarcado tras electroforesis, utilizando el anticuerpo primario anti-myc (Santa Cruz, dil. 1:200, apartado 15.4 de MyM) y una dilución 1:50000 del anticuerpo secundario anti-ratón peroxidasa, revelándose con el sistema quimioluminiscente ECL.

## RESULTADOS

---

Para poder determinar en más detalle el papel de Gprk2 en la ruta de señalización de Smo, iniciamos los estudios de la señalización de la ruta en células S2 en cultivo.

Como los anticuerpos disponibles comercialmente (Hybridoma Bank) de Smo no reconocen la proteína en inmunomarcados tras electroforesis, utilizamos el plásmido pUAS-myc-Smo y el pUAS-GFP-Smo (ver apartado 3.3.1 de MyM), cotransfectando de forma transitoria las células S2 con Actina-Gal4, para poder expresar constitutivamente myc-smo o GFP-smo en las células transfectadas.

Aunque las transfecciones con ambas construcciones mostraban la expresión de la proteína al analizarlas por el microscopio de inmunofluorescencia (**figura R 35A y B**), no éramos capaces de observarlas mediante inmunodetección, probablemente debido al rápido recambio metabólico de la proteína Smo. Por ese motivo, procedimos a la generación de una línea S2 que expresase de forma estable myc-smo, clonando el cDNA en el vector inducible pRmHa3(puromycin) (apartado 3.2 de MyM). Esto nos ha permitido detectar la proteína tanto por inmunofluorescencia (**figura R 35C**) como por técnicas de inmunodetección en lisados celulares (**figura R 35D**), por lo que estas células podrán ser utilizadas en futuros estudios sobre los mecanismos moleculares de participación de Gprk2 en la vía de señalización Hh/Smo.

## DISCUSIÓN



En los últimos años se ha hecho evidente que GRK2 presenta funciones celulares adicionales a su papel “clásico” en la desensibilización de GPCRs. Así, GRK2 fosforila también proteínas de membrana no GPCRs, como el receptor de PDGF (*Hildreth, 2004*) o los canales epiteliales de Na<sup>+</sup> (*Dinudom, 2004*), y proteínas citoplasmáticas como fosducinas, sinucleinas, tubulinas, ezrinas, o el factor ribosomal P2 (*Ruiz-Gómez, 2000; Pronin, 2000; Pitcher, 1998; Carman, 1998; Cant, 2005; Freeman, 2002; Kohout, 2003*) lo que implica a GRK2 en procesos tan diversos como la síntesis de proteínas o la arquitectura del citoesqueleto. Por otro lado, GRK2, además de por su actividad quinasa, se caracteriza por tener diversos dominios de unión proteína-proteína que permiten su interacción con moléculas importantes en señalización (PI3K, inhibidor de Raf1, subunidad G $\alpha$ q y subunidades G $\beta\gamma$  de las proteínas G, el factor regulador de adhesiones focales GIT, etc (*Pitcher, 1998; Penela, 2003; Kohout, 2003; Lorenz, 2003; Gan, 2004*)).

En este contexto, uno de los objetivos del laboratorio es el de profundizar en el conocimiento de las interacciones de GRK2 con proteínas celulares (“Interactoma”) con el fin de tener una visión más amplia del papel de esta familia de quinasas en procesos celulares básicos. Para abordar este estudio, en esta tesis se han seguido dos tipos de aproximaciones experimentales. Por un lado, la búsqueda de nuevas interacciones de GRK2 en base a datos bibliográficos y, por otro lado, la caracterización fenotípica de la falta de función de homólogos de la quinasa en el modelo de *Drosophila*.

## 1.- LA FOSFORILACIÓN DE DREAM MEDIADA POR GRK2 REGULA EL TRÁFICO A LA MEMBRANA DE LOS CANALES DE POTASIO Kv4.2.

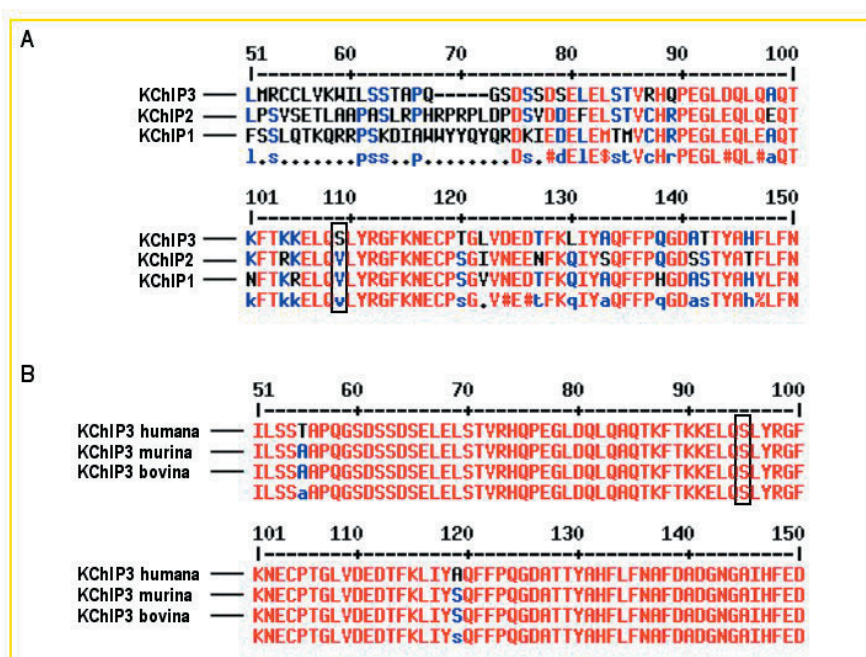
DREAM/Calsenilina/KChIP3 es un miembro de la familia de proteínas neuronales sensoras de Ca<sup>+2</sup> (NCS) (*Buxbaum, 1998*) que presenta distintas funciones en la célula dependiendo de su localización subcelular (ver Introducción, apartado 2). La elección de esta proteína como “posible proteína de interacción con GRK2” se basó en que proteínas de la familia NCS, entre los que cabría destacar CaM, regulan de forma diferencial a los distintos miembros de la familia GRK (*Pronin, 1997*), y al hallazgo, por parte del grupo de José Ramón Naranjo (Centro Nacional de Biotecnología), de una interacción entre DREAM y el dominio carboxilo terminal de GRK6.

Ensayos de fosforilación con proteínas recombinantes purificadas y de interacción “in situ”, nos han mostrado que DREAM/KChIP3/Calsenilina interacciona con y es sustrato no sólo de GRK6, sino también de GRK2. De hecho GRK2 fosforila a esta proteína más eficientemente. La fosforilación de His-DREAM por GRK2 tiene lugar rápidamente con una estequiometría  $\approx 0,8$  pmol Pi/pmol DREAM, cuando ambas proteínas están presentes a una concentración entre 25-50 nM, de tal manera que DREAM puede ser considerada un buen sustrato de GRK2. De hecho, la Km de la reacción de fosforilación de DREAM por GRK2 es menor que la que se ha descrito para otros sustratos de esta quinasa (*Freeman, 2002; Pronin, 2000; Ruiz-Gómez, 2000*) como, por ejemplo, los receptores  $\beta$ -adrenergénicos activados, que en un principio dieron nombre a esta quinasa ( $\beta$ -ARK) y que presentan una Km de 0,2  $\mu$ M (*Benovic, 1987*). Esto podría estar dando idea de una notable “afinidad” de la quinasa por este sustrato.

A pesar de que las proteínas neuronales sensoras de calcio, familia a la que pertenece DREAM/calsenilina/KChIP3, son capaces de modular la actividad de distintos miembros de la familia de GRKs (rev. en *Sallese, 2000*), nuestros resultados muestran la fosforilación de DREAM sin que la actividad de GRK2 frente a otros sustratos se vea afectada.

## DISCUSIÓN

El análisis de DREAM fosforilado indica la existencia de un sitio preferente de fosforilación, identificado como el residuo Ser95 en el servicio de proteómica de la Red Cardiovascular del Instituto de Salud Carlos III (RECAVA). Al igual que los receptores y los sustratos solubles de GRK2 descritos hasta la actualidad (revisado en Ribas, 2007), DREAM presenta residuo(s) ácido(s) próximo(s) al sitio de fosforilación identificado ELQ**S**LYR. Además, tanto la Ser95 como los residuos ácidos próximos están conservados en la proteína DREAM de distintas especies de mamíferos, mientras que el análisis de secuencia de otros miembros de la subfamilia de sensores de calcio KChIP no ha revelado la existencia de ningún residuo de Ser equivalente en el resto de KChIPs (ver **figura D 1**), sugiriendo que GRK2 sólo fosforila específicamente a este miembro de la familia.



**FIGURA D 1.- ALINEAMIENTO DE MIEMBROS DE LA FAMILIA KChIP.**

A) Alineamiento de las secuencias de las distintas proteínas KChIPs humanas (programa MultiAlin): KChIP1 (gi73621122), KChIP2 (gi73621125) y KChIP3 (gi13431428). El recuadro marca la Ser95 de KChIP3, identificada como sitio preferente de fosforilación por GRK2, y los aminoácidos equivalentes en el resto de los miembros de la familia.

B) Alineamiento de las secuencias de KChIP3 correspondientes a distintas especies de mamíferos: humano (gi13431428), ratón (gi73620954) y vaca (gi122143674). En este caso también se recuadra la Ser95.

DREAM presenta dos dominios LCD (posiciones 47 y 155 (Ledo, 2002)) que, además de permitir su asociación con CREM, han sido identificados como los sitios de interacción con GRK2 y GRK6. El hecho de que el doble mutante de los sitios LCD de DREAM, presente una fosforilación por GRK2 un 50% menor que la observada para la forma salvaje, hace pensar que probablemente existan interacciones adicionales, independientes de los dominios LCD, que permitan la fosforilación de estos mutantes por GRK2, aunque la presencia de los dominios aumente la eficiencia de la fosforilación.

Tanto DREAM (en ausencia de PSs o canales Kv4), como GRK2, presentan una localización mayoritariamente citoplasmática. Ahora bien, los datos presentados en esta memoria no permiten determinar si la interacción entre estas proteínas tiene lugar en este compartimento o si el cambio de localización, promovido por distintos estímulos y/o expresión de proteínas determinadas (Ej: la presencia de PSs podría localizar a DREAM en RE (Lilliehook, 2002), donde también co-localizaría con GRK2; o la de los Kv4 en la membrana plasmática, donde también podría co-localizar con GRK2) es lo que lleva a la interacción y fosforilación de DREAM por esta quinasa. La identificación del compartimento subcelular, donde tiene lugar la interacción y la fosforilación, y de las rutas de señalización implicadas en promover dicha reacción, son eventos que se desconocen y cuya investigación podría resultar interesante abordar en el futuro.



Se sabe que los niveles de calcio (*Mellström, 2001*) y la fosforilación por distintas quinasas pueden regular la actividad transcripcional de DREAM. Se ha descrito que la activación de la ruta de PI3K induce la fosforilación de DREAM, favoreciendo su unión al DNA y bloqueando la transcripción del gen apoptótico *hrk* en células hematopoiéticas progenitoras (*Sanz, 2001*). Sin embargo, no se ha observado diferencia en la capacidad represora de la transcripción de los mutantes de fosforilación de DREAM por GRK2 (DREAM-S95A y DREAM-S95D), respecto a la forma de DREAM salvaje (datos no presentados en esta memoria, realizados en el laboratorio de José Ramón Naranjo).

Como ya se ha mencionado anteriormente, DREAM es también conocida como KChIP3 (K<sup>+</sup>-Channel-Interacting-Protein 3). Los canales de potasio dependientes de voltaje controlan la corriente de K<sup>+</sup> de tipo A que modula la excitabilidad de neuronas y cardiomiocitos (*Schrader, 2002*). Estos canales se encuentran retenidos en el retículo endoplasmático y requieren la asociación de proteínas para enmascarar su señal de retención en el retículo y permitir su tráfico a la membrana plasmática, donde desarrollan su función (*Ma, 2002*). La unión de KChIP facilita la redistribución de la proteína Kv4 a la superficie celular, provocando un incremento en la corriente y cambios significativos en las propiedades cinéticas del canal (*Kunjilwar, 2004*). El aumento de la expresión de corriente de los canales Kv4 en la membrana plasmática tras la cotransfección con KChIPs es un proceso complejo que implica un aumento de la tetramerización del canal en el retículo, un aumento del número de canales ensamblados y un incremento de la expresión de membrana de los complejos de canal (*Takimoto, 2002; Malin, 2000; Shibata, 2003; Strang, 2003*). Para que las proteínas auxiliares KChIPs puedan llevar a cabo su papel necesitan estar palmitoiladas, ya que mutantes de palmitoilación son deficientes en la localización del canal en la membrana.

Nuestros datos muestran que la fosforilación de DREAM (KChIP3) por GRK2 parece estar implicada en la regulación de la función de los canales de potasio Kv4. La co-expresión de Calsenilina/DREAM/KChIP3 aumenta la densidad de corriente y promueve la localización de DREAM en la membrana. Datos presentados por distintos autores muestran la translocalización de estos canales del RE a la membrana plasmática por la co-expresión con distintas KChIPs (*Shibata, 2003; Hasdemir, 2005*). Esto nos permite asumir que el movimiento a la membrana plasmática de EGFP-DREAM, observado por microscopia confocal, es consecuencia de la redistribución de los canales a la membrana. El mutante que mimetiza el estado constitutivamente fosforilado de DREAM-S95D da lugar a una densidad de corriente un 50% menor que la observada cuando sólo se sobre-expresa la subunidad Kv4.2. del canal. Este efecto parece ser consecuencia de un tráfico deficiente del canal cuando DREAM es fosforilada por GRK2, pues la fosforilación impide la localización del canal en la membrana. Aunque los datos electrofisiológicos parecen indicar que la co-expresión del mutante no fosforilable de DREAM (DREAM S95A) con Kv4 aumenta significativamente la densidad de corriente (reflejo de la translocación del canal a la membrana plasmática), no se observaba la translocación de EGFP-DREAM S95A a la membrana, como con DREAM salvaje, lo que sugiere la existencia de una fosforilación/desfosforilación dinámica de DREAM salvaje por GRK2.

En su conjunto, estos datos apuntan a la necesidad de un sistema de fosforilación/desfosforilación de DREAM por GRK2 que permita el correcto ensamblaje/tráfico/propiedades del canal Kv4. Una posibilidad que nos planteamos durante el desarrollo de este trabajo era que la fosforilación/desfosforilación fuese necesaria para la tetramerización de los canales y su posterior tráfico a membrana, de forma que DREAM debía ser fosforilado en el retículo para que la tetramerización del canal tuviese lugar y, posteriormente, de-fosforilado para su tráfico a la membrana plasmática. Sin embargo, los resultados obtenidos con los mutantes (datos no presentados) o inhibidores de fosfatasa nos muestran que la fosforilación no interfiere en la tetramerización del canal. Por tanto, la fosforilación de DREAM por GRK2 afecta a la función de DREAM sobre el canal en un estadio posterior.

## DISCUSIÓN

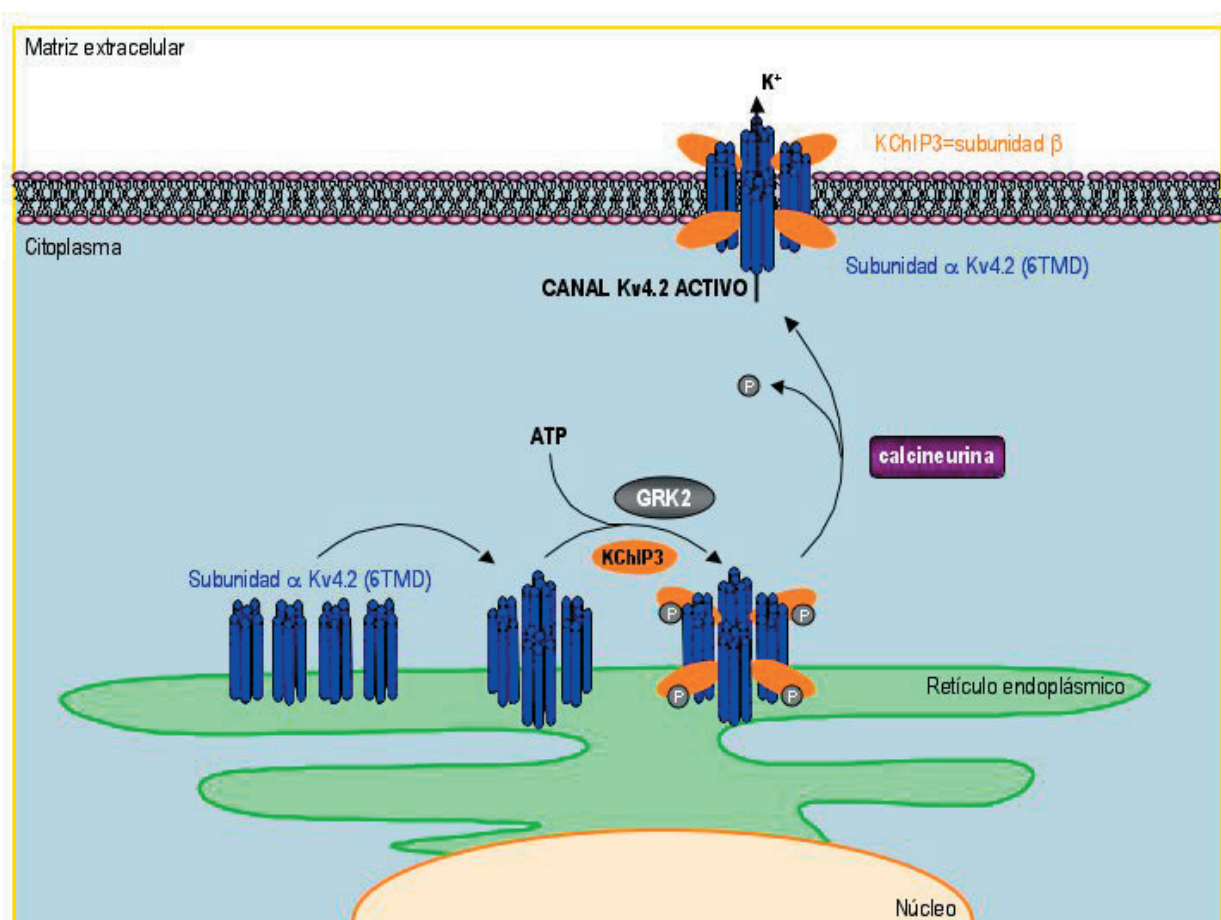
La fosforilación ya había sido descrita como una forma de modular los canales de potasio dependientes de voltaje. La fosforilación de la subunidad Kv4.2 tanto por PKA (Ser552) (*Schrader, 2002*) como por ERK/MAPK (Thr607) (*Schrader, 2006*) es necesaria, pero no suficiente, para la modulación del canal. Las quinasas requieren la presencia de las proteínas de interacción (KChIP) para llevar a cabo su función. Parece existir una relación, regulada espacialmente, entre las características funcionales de los canales Kv4.2., la interacción con KChIPs, la fosforilación y la actividad sináptica (*Shibata, 2003*). Por otro lado, se ha descrito que PKA también fosforila KChIP3 en S11 y en S14. Sin embargo, ni el mutante S14A ni el doble mutante S11A, S14A parecen tener efecto en la función del canal cuando el mutante de DREAM se co-expresa con Kv4.2 (*Schrader, 2002*).

Para abordar el papel que la desfosforilación de DREAM podía tener sobre las propiedades del canal, realizamos los ensayos en presencia de inhibidores de la fosfatasa calcineurina, que hemos visto es capaz de desfosforilar el sitio modificado por GRK2. Los datos muestran que la desfosforilación de DREAM también afecta a la función del canal Kv4.2., pues la presencia de inhibidores de calcineurina bloquea el aumento en la densidad de corriente inducido por DREAM, efecto acompañado por una localización irregular y menor de EGFP-DREAM en la membrana. Estos datos apuntan a la necesidad de que la fosfatasa actúe sobre DREAM para que tenga lugar el correcto tráfico del canal completo a la membrana.

Por otro lado, la co-expresión del mutante de DREAM insensible a  $\text{Ca}^{+2}$  (mutado en sus dominios EF, EFmDREAM) junto con los canales Kv4 lleva, igualmente, a una localización difusa de DREAM en la célula. Este mutante que interacciona y es fosforilado por la quinasa (datos no presentados), al ser insensible al  $\text{Ca}^{+2}$ , podría quedar unido constitutivamente a GRK2, siendo incapaz de separarse de la quinasa. En este sentido, nuestros datos muestran que calcineurina rescata la localización de EFmDREAM en la membrana.

Todo ello es compatible con la hipótesis de que el acoplamiento de los procesos de fosforilación/desfosforilación de DREAM por GRK2 regula el tráfico, y por tanto, la función de los canales de potasio dependientes de voltaje, tras la tetramerización de los mismos.

En un entorno celular, el principal modulador de este proceso de fosforilación/desfosforilación de DREAM podría ser el calcio. Por un lado, resultados del grupo de J. R. Naranjo muestran que la interacción entre GRKs y DREAM es dependiente de calcio, pues niveles de 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  conllevan una disminución de la asociación entre ambas proteínas. Además, en el laboratorio hemos comprobado que, al igual que ocurre con otros sustratos (*Pronin, 1997; Kabbani, 2002*), GRK2 presenta menor actividad frente a DREAM a concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$  de 10  $\mu\text{M}$  (datos no mostrados). Por otro lado, la actividad de calcineurina es controlada por dos proteínas de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , estructuralmente similares pero funcionalmente diferentes, calmodulina (proteína sensora de  $\text{Ca}^{2+}$ ) y calcineurina B (subunidad reguladora de calcineurina). A concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  inferiores a 0,1 nM la subunidad reguladora se une a calcineurina pero la enzima es inactiva. Es necesario un aumento de los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  para que la fosfatasa se active por unión de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (*Shibasaki, 2002*). De esta manera podría sugerirse que, en condiciones basales, GRK2 estaría fosforilando a DREAM, probablemente en el RE, y que DREAM fosforilada por GRK2 en su serina 95, formaría parte del canal de potasio retenido en el retículo. Un aumento de los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$ , por una señal aún por determinar, por un lado provocaría la ruptura de la asociación entre DREAM y GRK2, impidiendo que tuviese lugar la fosforilación, y, por otro, la activación de la calcineurina que favorecería la desfosforilación. DREAM desfosforilado, asociado al tetrámero de subunidades  $\alpha$  Kv4.2 formando un octámero, se translocaría a la membrana plasmática para constituir el canal activo (**figura D 2**).



**FIGURA D 2.- MODELO DEL EFECTO DE LA FOSFORILACIÓN/DESFOSFORILACIÓN DE KChIP3 EN SU FUNCIÓN SOBRE LOS CANALES KV4.2.**

En ausencia de KChIP3 se produce la oligomerización de las subunidades Kv4.2 a través de sus dominios hidrofóbicos. Los agregados Kv4.2 son retenidos en el retículo endoplásmico y, posteriormente, degradados (Shibata, 2003).

La fosforilación de KChIP3 por GRK2 podría estar favoreciendo la unión de las subunidades β (KChIP3) a las subunidades α (Kv4.2) del canal, posiblemente estabilizándolas. Pero es necesario que tenga lugar la desfosforilación para que las subunidades KChIP3 adquieran la conformación adecuada para ocultar la señal de retención en el RE y permitir que el canal completo se transloque a la membrana plasmática.

Una vez en la membrana, el canal formará un poro activo capaz de transmitir la corriente.

En este sentido, nuestro grupo también ha descrito un proceso dinámico similar de fosforilación/desfosforilación de GIT, proteína adaptadora implicada en procesos de migración, por GRK2, que modula la actividad de la ruta de Rac/PAK/MEK/ERK en respuesta a adhesión y a esfingosina-1-fosfato (S1P) en células epiteliales (Penela, 2008).

## 2.- GRK2 MODULA LA ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD DE PRESENILINA 1 (PS1).

Puesto que DREAM interacciona con el dominio carboxilo terminal de PS1 y 2 (Buxbaum, 1998) en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi y que, según datos de nuestro grupo, GRK2 puede localizarse, además de en el citosol, asociada a membranas internas microsomales (García Higuera, 1994; Murga, 1996; Aragay, 1998), decidimos caracterizar el efecto de PSs en la fosforilación de DREAM por GRK2.

## DISCUSIÓN

Como hemos indicado en la introducción, el heterodímero de PS1 (PS1-NTF y PS1-CTF) forma parte, junto con nicastrina (Yu, 2000), Aph-1 (anterior pharynx defective 1) (Goutte, 2002) y Pen-2 (presenilin enhancer 2) (Francis, 2002), del complejo multiproteico de alto peso molecular “ $\gamma$ -secretasa”, con actividad proteasa, que ha sido implicado en el procesamiento de distintas proteínas de membrana de Tipo 1 (APP, Notch, N-cadherinas, etc.) (Selkoe, 2003; Wolfe, 2004; Medina, 2003). Pero, además, PS interacciona con múltiples proteínas para desempeñar funciones celulares, independientemente de su actividad “ $\gamma$ -secretasa”.

El estudio del efecto de PS1 sobre la fosforilación de DREAM, nos reveló que ninguno de los dos dominios utilizados (bucle citosólico y extremo carboxilo-terminal) afectaba a la fosforilación de DREAM por GRK2, pero nos llevó a la identificación de PS1 como un “nuevo” sustrato de esta quinasa. Así, hemos mostrado que, tanto el bucle citoplasmático como el dominio carboxilo terminal de PS1, interaccionan “in vitro” tanto con GRK2 recombinante purificado como con la quinasa presente en un extracto citosólico de cerebro de rata. Además, esta interacción parece también tener lugar de forma natural en la célula, pues no sólo las proteínas sobre-expresadas, sino también las proteínas PS1 y GRK2 endógenas co-inmunoprecipitan. Estos datos nos están indicando que hay una interacción directa entre ambas proteínas y que la asociación entre GRK2 y PS1 tiene lugar tanto con la proteína no procesada (vemos la co-inmunoprecipitación con la forma entera de PS1 en los ensayos de sobre-expresión) como con la forma procesada (co-inmunoprecipitación de los fragmentos NTF y CTF con GRK2).

En la actualidad existe gran controversia sobre la topología transmembrana de PS. Como hemos indicado en la introducción, cada vez más autores se están decantando por la topología de 9 TMD, donde el dominio C-terminal estaría embebido en la membrana lipídica (revisado en Dries, 2008). Nuestros datos, por el contrario, estarían apoyando el modelo de 8 TMD pues GRK2 es una proteína principalmente citoplasmática que parece estar interaccionando tanto con el bucle comprendido entre los TMD 6 y 7, que de forma independiente de la topología propuesta estaría situado hacia el lado citoplasmático de la célula, como con el extremo C-terminal. Por tanto, ambas regiones deben estar localizadas en el citoplasma. Tanto nuestros datos como el hecho de que calsenilina/DREAM/KChIP3 interaccione con el dominio C-terminal de PS1, estarían apoyando la topología de 8 dominios transmembrana para PSs (Doan, 1996; Li, 1998).

Aunque tanto el bucle citoplasmático como el dominio carboxilo terminal de PS1 interaccionan con GRK2, sólo el bucle citoplasmático es fosforilado por la quinasa. El dominio C-terminal de PS1 parece ejercer un efecto inhibitorio sobre GRK2, lo que sugiere que GRK2 podría encontrarse en la célula, en condiciones basales, interaccionando tanto con el bucle citoplasmático como con el dominio Ct de PS1, lo que inhibiría la actividad basal de la quinasa, siendo necesario un estímulo para inducir la ruptura de la unión entre GRK2 y el dominio Ct y, por tanto, la activación de la quinasa, promoviendo así la eficaz fosforilación del bucle citoplasmático.

La caracterización de la fosforilación de la proteína de fusión a GST del dominio citoplasmático de PS1 por GRK2 muestra una menor estequiometría y una mayor Km (aunque también en el rango nM) que las obtenidas para la fosforilación de DREAM. El hecho de que las características cinéticas de la reacción de fosforilación de PS1 por GRK2 sean “peores” que las obtenidas para DREAM, nos puede hacer pensar que DREAM es mejor sustrato de la quinasa. Sin embargo, los datos son difíciles de extrapolar porque, por una parte, en estos ensayos utilizamos dominios de PS1 fusionados a GST y no la proteína entera (o el heterodímero NTF/CTF) y, por otra parte, se realizan en ausencia de estímulo, por lo que estos valores podrían variar en la célula donde PS forma parte del complejo multiproteico  $\gamma$ -secretasa.

El hecho de que tanto PS1 como DREAM/KChIP3/Calsenilina sean fosforiladas por GRK2 (u otras GRKs) abre la posibilidad de un papel importante para estas fosforilaciones en la modulación de la interacción entre

ambas proteínas (Buxbaum, 1998) y en su efecto sobre la regulación de la señal de calcio y la apoptosis (Lilliehook, 2002; Orrenius, 2003; Bezprozvanny, 2008; revisado en Hass, 2008), proceso aún no abordado en el laboratorio.

Datos bibliográficos habían implicado la activación de ciertos tipos de GPCRs, en concreto los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos y opiáceos, en la estimulación de la actividad  $\gamma$ -secretasa sobre el APP, proceso que depende de la internalización de los esos receptores (Ni, 2006). En esta memoria hemos mostrado que la estimulación e internalización de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos provoca un aumento de la interacción entre PS1 y GRK2. Ni, Y. y cols. mencionan (como datos no mostrados) que para que se produzca el efecto de la activación de los receptores sobre la actividad  $\gamma$ -secretasa se requiere la presencia de GRK2, ya que la eliminación de la quinasa por tratamiento con RNAi impide dicho efecto. Los autores apuntan al papel de la quinasa en la internalización de los receptores, pero nuestros datos parecen indicar que GRK2 estaría actuando, además de como mediador de la internalización del receptor adrenérgico, como regulador de PS1 por fosforilación.

El hecho de que la fosforilación de GRK2 por las quinasas c-Src y ERK, que también son activadas en respuesta a la estimulación de GPCRs (Elorza, 2000; Sarnago, 1999), también favorezca la interacción de GRK2 con PS1, apoya la hipótesis de que la estimulación de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos (u opiáceos) llevaría al reclutamiento de GRK2 a la membrana y a su activación, lo que podría aumentar la asociación entre PS1 y GRK en la membrana, además de producirse la fosforilación del receptor. El receptor fosforilado reclutaría  $\beta$ -arrestina que llevaría a la fosforilación de GRK2 por la Thr/Ser quinasa ERK y la TyrK cSrc que, por un lado, modularían la actividad y la estabilidad de GRK2 (Elorza, 2000; Sarnago, 1999) y, por otro, favorecerían su interacción con PS1. Además, tendría lugar la internalización de estos receptores junto con GRK2 y el complejo  $\gamma$ -secretasa a los endosomas, paso previo a la localización del complejo en los lisosomas, donde actuaría sobre el APP (Pasternak, 2004). La fosforilación por GRK2 de PS1 podría tener lugar en distintos puntos dentro de esta secuencia de activación (figura D 3).

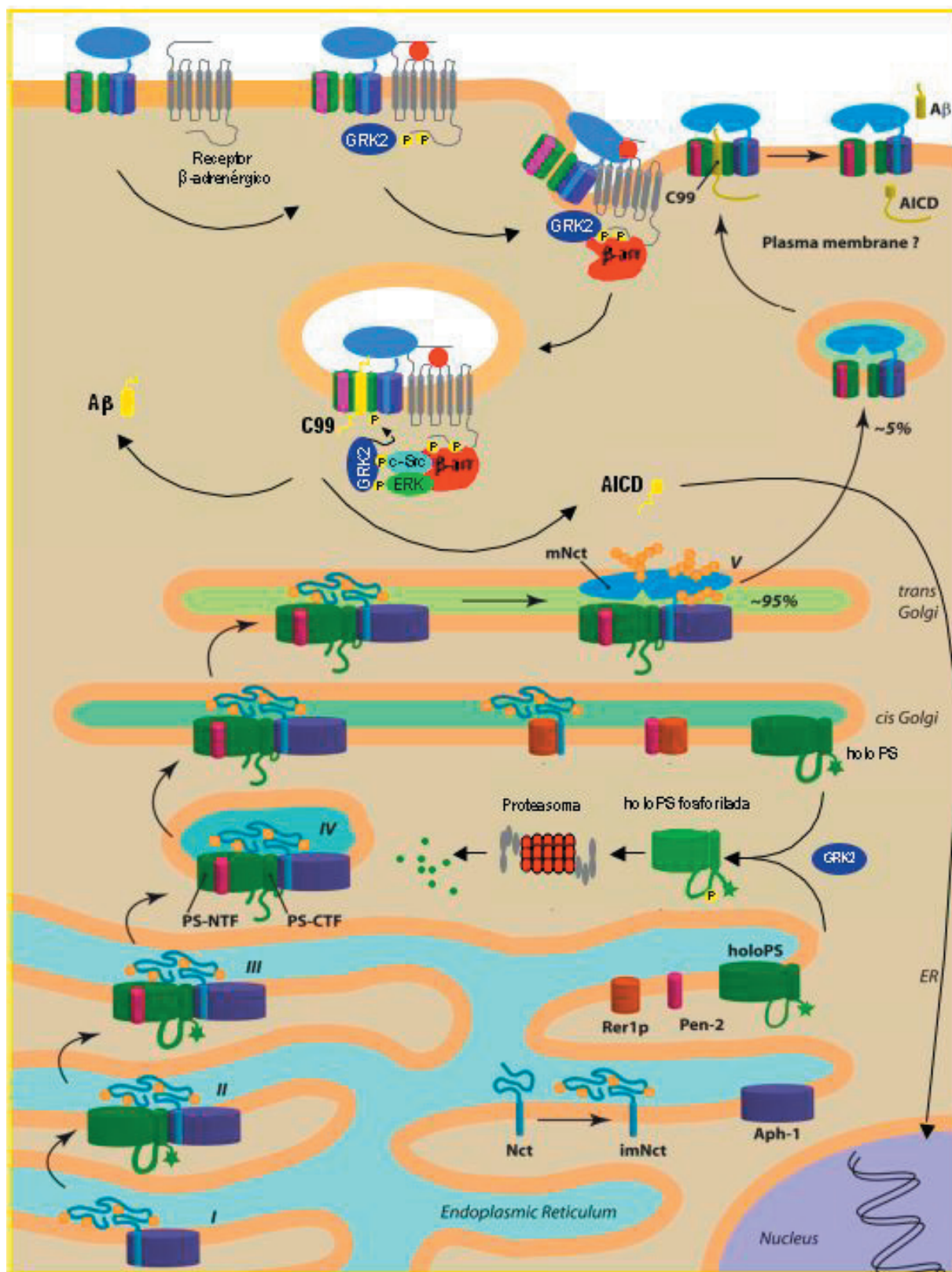
¿Cuáles son las consecuencias funcionales de la fosforilación de PS1 por GRK2?. Como ya hemos indicado, PS1 es fosforilada por distintas quinasas: PKA (Ser310) (Fluhrer, 2004), PKC (Ser346) (Fluhrer, 2004), GSK3- $\beta$  (Ser353 y 357) (Kirschenbaum, 2001), Cdk5 (Ser354) (Lau, 2002) y JNK (c-Jun N-terminal kinase) (Ser319 y Thr320) (Kuo, 2008). Todas las quinasas fosforilan PS1 dentro del bucle citoplasmático, al igual que ocurre con la fosforilación por GRK2, con efectos funcionales diferentes sobre PS1. Por una parte, la fosforilación se ha descrito como un mecanismo de modulación del propio metabolismo de PS1. La producción del dímero activo NTF/CTF, núcleo de la actividad  $\gamma$ -secretasa, es un proceso más complejo que la simple endoproteólisis e implica eventos adicionales. Los fragmentos endoproteolíticos NTF y CTF son generados en exceso y es la fosforilación en la Ser357 por GSK3- $\beta$  la que estimula la degradación del fragmento PS1-CTF sobrante (Kirschbaum, 2001), sin afectar al fragmento PS1-NTF. Contrario al efecto de GSK3- $\beta$ , la fosforilación de PS1 por JNK y Cdk5 aumenta la estabilidad del fragmento PS1-CTF (Kuo, 2008; Lau, 2002), favoreciendo el ensamblaje y la estabilidad del complejo  $\gamma$ -secretasa (Bergman, 2004).

Nuestros resultados muestran que la sobre-expresión de GRK2 provoca un aumento de la velocidad de degradación de la holoproteína PS1, proceso que tiene lugar por la vía del proteasoma. El hecho de que la sobre-expresión del mutante GRK2<sup>K220R</sup>, que carece de actividad catalítica, no ejerza el mismo efecto nos sugiere que es la fosforilación de PS1 por GRK2, y no la interacción entre ambas proteínas, la implicada en la regulación del metabolismo de PS1. El procesamiento y estabilidad de PS1 depende de la presencia y cantidad de los demás componentes del complejo  $\gamma$ -secretasa, de forma que la proteína sintetizada que no es correctamente procesada se degrada por la vía del proteasoma (Ratoviski, 1997; Capell, 1998; Honda, 1999). Nuestros datos podrían presentar a GRK2 como la quinasa responsable de fosforilar PS1 no procesada correctamente (o en exceso)



## DISCUSIÓN

en el RE, marcando la proteína para su degradación por la vía del proteasoma (**figura D 3**). Estos datos estarían apoyados por la localización de ambas proteínas en el RE, como lo muestran los estudios de co-localización por inmunofluorescencia.





**FIGURA D 3.- MODELO DEL EFECTO DE GRK2 EN EL METABOLISMO Y ACTIVIDAD DE PS1.**

Los cuatro componentes del complejo  $\gamma$ -secretasa son sintetizados en el RE, donde aguardan su incorporación al complejo estable. Los componentes no incorporados son degradados, como es el caso de PS1 no endoproteolizada. GRK2 podría estar fosforilando esta forma de PS para dirigirla a degradación por la vía del proteasoma.

Nct es rápidamente N-glicosilada para generar una forma inmadura, imNct. imNct se une a Aph-1 en el RE para formar un complejo 1:1 estable (*subcomplejo I*). Este heterodímero se une a la holoproteína PS que no ha sido degradada (*subcomplejo II*). El trímero imNct-Aph1-holoproteína PS puede unirse a Pen-2 para formar el *subcomplejo III*. Dentro del heterotetrámero, PS sufre rápidamente una endoproteólisis para formar los fragmentos N y C-terminales (PS-NTF y PS-CTF) (*subcomplejo IV*). La formación del *subcomplejo IV* bloquea las señales de retención en el RE y permite el paso del RE al Golgi vía compartimentos intermedios (ERGIC). En el trans-Golgi, Nct madura completamente a mNct (*subcomplejo V*). Este complejo constituye el complejo  $\gamma$ -secretasa activo (figura modificada de Dries, 2008).

El complejo  $\gamma$ -secretasa activo, aunque se localiza principalmente entre el RE y el Golgi, puede también encontrarse en la membrana plasmática (Chyung, 2005).

La estimulación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos favorece el reclutamiento de GRK2 a la membrana, iniciándose así el proceso de desensibilización. GRK2 fosforila al receptor activado, permitiendo la unión de  $\beta$ -arrestinas e iniciándose la internalización del receptor (Lefkowitz, 2004; Lefkowitz, 2005; Naga Prasad, 2001; Premont, 2007). Según datos bibliográficos, el complejo  $\gamma$ -secretasa localizado en la membrana podría ser co-internalizado junto al receptor (Ni, 2006).

Las  $\beta$ -arrestinas, aparte de su papel en la desensibilización de los receptores, pueden regular también la transducción de señales. El reclutamiento de quinasas como c-Src y ERK induce la fosforilación y modulación de GRK2 (Sarango, 1999; Elorza, 2000). Según nuestro modelo, la internalización del receptor, junto con el complejo  $\gamma$ -secretasa, unido a la fosforilación de GRK2 por c-Src y MAPK, estaría favoreciendo la interacción de la quinasa con PS1 en endosomas. GRK2, una vez liberada del efecto inhibitor del dominio C-terminal de PS1, llevaría a cabo la fosforilación del bucle citoplasmático de PS1, al igual que otras quinasas Ser/Thr, favoreciendo la actividad  $\gamma$ -secretasa frente a APP.

Los resultados obtenidos de la caracterización de los niveles de proteínas “in vivo” muestran niveles aumentados de los fragmentos PS1-NTF y PS1-CTF en extractos de cerebro de ratones heterocigotos para la deficiencia de GRK2 (ratones GRK2<sup>+/-</sup>), respecto a los ratones salvajes, especialmente en el hipocampo, región cerebral donde la actividad de PS1 es mayor. El hecho de que en presencia de menores niveles de GRK2 se produzca un aumento de los fragmentos de PS1 puede ser debido a que la falta de la quinasa induzca una menor degradación proteosomal de PS1 entera. Los niveles totales de la proteína aumentarían aunque el exceso de PS1-NTF y PS1-CTF generado no vaya necesariamente asociado a un aumento en la formación del complejo  $\gamma$ -secretasa, pues evidencias bioquímicas soportan la teoría de una estequiometría 1:1:1:1 para los cuatro componentes dentro del complejo (Sato, 2007) (figura D 3).

También se ha descrito que la fosforilación puede modificar la localización y función de PS1. La fosforilación de PS1 por GSK3- $\beta$  reduce su unión a N-caderina, impidiendo su localización en la superficie celular. La menor formación del complejo PS1/N-caderina/ $\beta$ -catenina provoca una reducción de la activación de la señal de supervivencia celular PI3K/Akt mediada por contacto. El efecto de esta fosforilación sobre la actividad  $\gamma$ -secretasa no es general, sino que afecta de forma específica al corte de un cierto tipo de sustratos. Así, la fosforilación de PS1 por GSK3- $\beta$  impide el corte  $\epsilon$  de N-caderina sin afectar al corte  $\epsilon$  de APP (Uemura, 2007), la sobre-expresión de CKI (Casein kinase I) aumenta la producción del péptido A $\beta$  (Flajolet, 2007) y la fosforilación de PS1 por JNK (Kuo, 2008) estimula la actividad  $\gamma$ -secretasa frente a APP promovida por TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ).

Nuestros datos apuntan a que la fosforilación por GRK2 también parece favorecer la actividad  $\gamma$ -secretasa frente a APP, pues la sobre-expresión del mutante inactivo de la quinasa (GRK2<sub>K220R</sub>), que actúa también como dominante negativo de la actividad quinasa endógena (Kong, 1994), conlleva un menor procesamiento del fragmento C99, producto del corte  $\beta$ -secretasa y sustrato del corte  $\gamma$ , frente al observado en presencia de GRK2 salvaje. Aunque la sobre-expresión de GRK2 no parece afectar “per se” a la actividad  $\gamma$ -secretasa, datos preliminares apuntan a que los mutantes que alteran la fosforilación por ERK (GRK2 670A y D) y, sobretudo, por c-Src (GRK2 Y2D y Y3F) modulan diferencialmente la actividad de la proteasa frente al APP, que aumenta moderadamente en presencia de mutantes que mimetizan la fosforilación y disminuye por la sobre-expresión de la

## DISCUSIÓN

formas no fosforilables de la quinasa, lo que apunta nuevamente a un papel del estado de fosforilación de GRK2, tras la estimulación del receptor, en la interacción y actividad del complejo.

Estudios realizados con preparaciones de membrana de animales salvajes o heterocigotos para la deficiencia de la quinasa muestran una menor producción del fragmento AICD en los ratones heterocigotos GRK2 +/- respecto a los salvajes. Esto es coherente con la idea de que el aumento en los niveles de los fragmentos PS1-NTF y PS1-CTF observado cuando los niveles de GRK2 disminuyen, no conlleva un aumento en la formación de complejos  $\gamma$ -secretasa activos. En esas circunstancias, no sólo no se produce un aumento de la actividad  $\gamma$ -secretasa sino que tiene lugar una disminución, porque la quinasa parece tener un efecto directo sobre esta actividad. En definitiva, GRK2 parece regular, por una parte, el metabolismo de PS1 entera y, por otra parte, la actividad  $\gamma$ -secretasa frente a APP (**figura D 3**).

Se ha descrito que la activación del receptor  $\beta$ -adrenérgico estimula la actividad  $\gamma$ -secretasa y acelera la formación de la placa amiloide (Ni, 2006). Cabe la posibilidad, por tanto, de que sea la estimulación del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico la que favorezca el reclutamiento de GRK2 al entorno del receptor, induciendo su fosforilación e internalización, junto con el complejo  $\gamma$ -secretasa, a endosomas. Aquí, GRK2 podría interaccionar con PS1 y, una vez liberada del efecto inhibitorio del dominio C-terminal de PS1, llevar a cabo la fosforilación de la proteína, induciendo un aumento de la actividad  $\gamma$ -secretasa frente a APP y, por tanto, un aumento de la producción del péptido  $\beta$ -amiloide (**figura D 3**).

El hecho de que GRK2 favorezca la generación del péptido  $\beta$ -amiloide, principal componente de las placas seniles características de los cerebros de los enfermos de Alzheimer, de que se observe una actividad y una distribución anormal de GRK2 en estadios tempranos de la enfermedad de Alzheimer (Suo, 2004) y de que tanto el mRNA como la expresión de GRK2 están aumentados en linfocitos de pacientes con esta enfermedad (Leosco, 2007), hacen pensar que la quinasa podría tener un papel importante en distintos aspectos de la patogénesis de Alzheimer incluyendo la formación de ovillos neurofibrilares, neurotoxicidad, inflamación del cerebro, etc.

Además, se ha descrito el papel regulador del complejo  $\gamma$ -secretasa en angiogénesis (revisado en Boulton, 2008), proceso en el que, según datos preliminares de nuestro laboratorio, GRK2 también tiene una participación activa. La disminución de los niveles de GRK2 en células endoteliales de ratones heterocigotos para GRK2 (GRK2 +/-) provoca una respuesta angiogénica defectiva "in vivo", las células son capaces de proliferar y migrar pero no forman vasos maduros. Por tanto, el análisis del efecto de la fosforilación de PS1 por GRK2 sobre sustratos implicados en angiogénesis como Notch, VEGFR-1, caderinas o ErbB4 podría resultar también interesante.

El procesamiento  $\gamma$ -secretasa de Notch y del receptor tirosina quinasa ErbB4, además de tener un papel angiogénico, podría tener un papel en procesos tumorales. Por un lado, el aumento de la señal de Notch conlleva un aumento de la proliferación de células precursoras inmaduras y, con ello, el desarrollo de enfermedades neoplásicas y cánceres de pulmón, ovario y mama (Selkoe, 2007). Por otro lado, el fragmento ErbB4-ICD se transloca al núcleo donde fosforila a la E3 ubiquitin-ligasa Mdm2, favoreciendo su ubiquitinación, degradación por la vía del proteasoma y, por tanto, aumento de los niveles de p53 (gen supresor de tumores) (Arasada, 2005; Levine, 2004). En este sentido, datos de nuestro grupo muestran cambios en los niveles de GRK2 en muestras de cáncer de mama (Salcedo, A. Manuscrito en preparación), que podrían estar afectando a la actividad  $\gamma$ -secretasa en un contexto tumoral.

Por todo ello, sería interesante profundizar en el estudio del efecto de GRK2 en la actividad  $\gamma$ -secretasa sobre otros sustratos y en funciones de PS1 independientes de su actividad  $\gamma$ -secretasa.

### 3.- LA QUINASA REGULADORA DE GPCRs GPRK2 PARTICIPA EN LA SEÑAL DE HEDGEHOG EN *DROSOPHILA*.

Como hemos mencionado en la introducción, en *Drosophila* hay dos homólogos de GRKs, Gprk1 y Gprk2. A pesar de que Gprk1 presenta mayor homología de secuencia con GRK2-3, se ha descrito que desempeña una función asociada a la de GRK1 en mamíferos. Esto, junto a la disponibilidad limitada de armas experimentales en el momento de la realización de esta tesis, nos hizo centrarnos en el estudio del papel de Gprk2 en la búsqueda de nuevas funciones para esta familia de quinasas.

La generación del cDNA completo de *Gprk2* y el desarrollo del anticuerpo contra su región amino-terminal nos ha permitido sobre-expresar la quinasa en células S2 y comprobar que, al igual que sus homólogos de secuencia en mamíferos GRK4-6, Gprk2 se encuentra constitutivamente en la membrana plasmática, aunque en la actualidad aún no hemos determinado si la asociación se realiza en base a una región rica en aminoácidos cargados, similar a la presente en GRK5, o a modificaciones lipídicas, como ocurre con GRK4 y 6. La localización en membrana de la quinasa se confirma al estudiar su localización en células de disco imaginal de ala.

Al igual que hemos observado para GRK2 en ratones (Sefton, 2000), el estudio de la expresión de *Gprk2* en embriones de *Drosophila* nos muestra que *Gprk2* se expresa desde estadios tempranos, presentando una expresión ubicua con niveles de expresión más elevados en mesodermo y, en estadios posteriores, en sistema nervioso y corazón. Por tanto, Gprk2, al igual que GRK2 en mamíferos (Jaber, 1996; Sefton, 2000), parece ser importante durante el desarrollo embrionario.

Para abordar el estudio del papel de la quinasa Gprk2 en *Drosophila*, iniciamos una colaboración con el grupo del Dr. José Félix de Celis, del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Comenzamos caracterizando la expresión y el efecto de la falta de función de esta quinasa en el disco imaginal de ala. Los resultados obtenidos de analizar la expresión de *Gprk2*, tanto mediante ensayos de expresión con sondas sentido y antisentido como mediante la tinción  $\beta$ -gal del mutante de inserción *Gprk2*<sup>06936</sup> *P-lac Z* muestran que, aunque *Gprk2* se expresa en todo el disco de ala, la expresión aparece aumentada en las células anteriores del borde A/P co-localizando con Ptc. Puesto que Hh, actuando como morfógeno, se expresa en el compartimento posterior y señala en el compartimento anterior, generándose un gradiente de concentración, estos datos parecían señalar que la expresión de altos niveles de *Gprk2* podría estar regulada por Hh en las células anteriores del borde A/P.

Con objeto de buscar nuevas dianas celulares y funcionales de GRK2 he participado, con el grupo de José Félix de Celis (CBMSO), en la generación de una línea transgénica de *Drosophila melanogaster* que expresa el RNA interferente de *Gprk2* bajo el control del promotor UAS. La caracterización de estos individuos nos ha mostrado que la disminución de los niveles de Gprk2 en el disco imaginal de ala conduce a la reducción de la expresión de los genes diana de la ruta de Hh y causa un fenotipo reminiscente de pérdida de función de Smo, observándose la reducción del tamaño de la intervena L3/L4, territorio especificado por la ruta Hh (Crozatier, 2002), y fenotipos similares a los obtenidos por la expresión ectópica de Ptc o la disminución generalizada de los niveles de Hh. Por tanto, estos datos nos estaban indicando que Gprk2 es necesaria para que tenga lugar la transducción de la señal de Smo.

## DISCUSIÓN

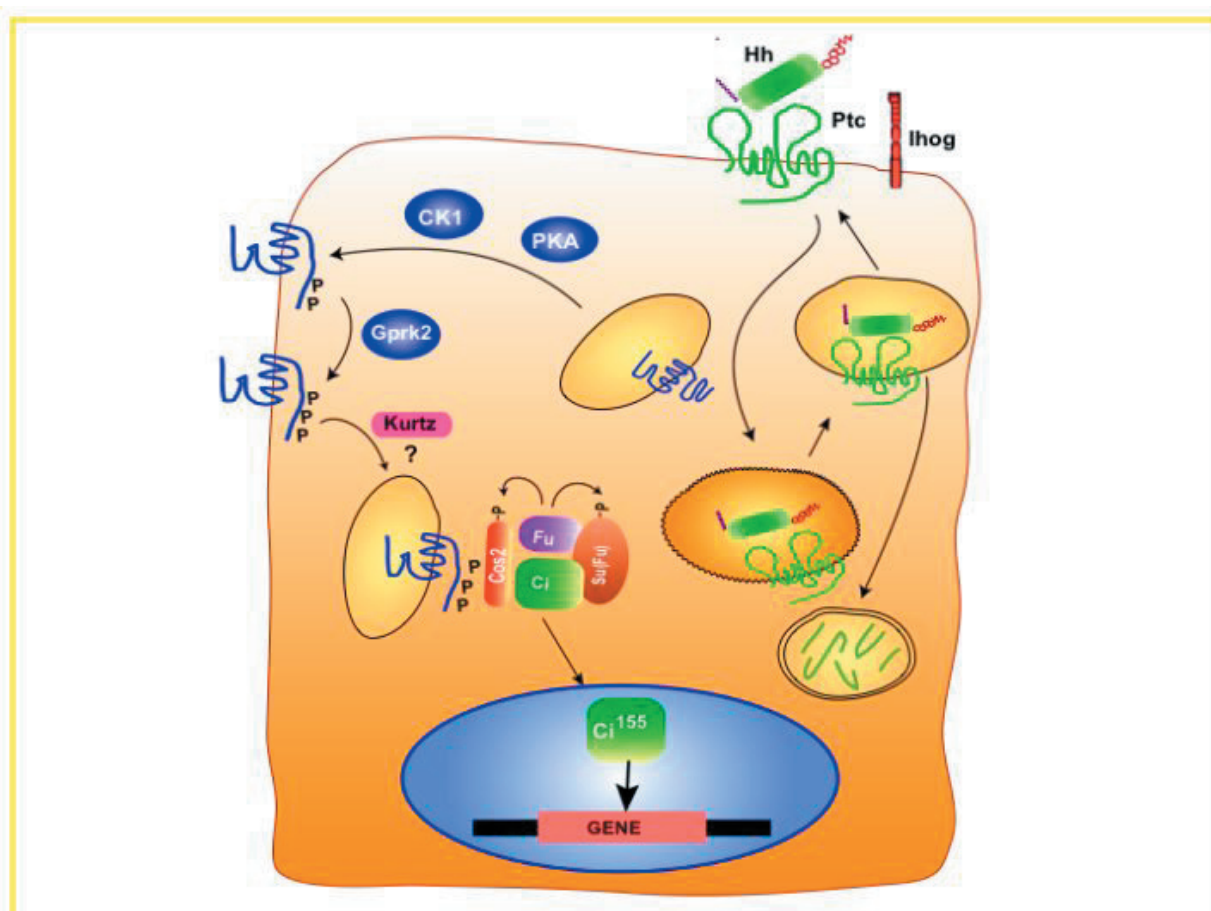
El resultado nos pareció en cierto modo sorprendente pues, en base a los resultados obtenidos anteriormente, según los cuales la fosforilación de PS1 por GRK2 favorece la actividad  $\gamma$ -secretasa, pensamos que la reducción de los niveles de Gprk2 en el disco de ala de *Drosophila* debía mostrar un fenotipo de falta de función de Notch y, sin embargo, sólo obtuvimos un fenotipo de falta de función de Smo. Esto puede ser debido a que Gprk2 no desempeñe exactamente las mismas funciones que GRK2 en mamíferos y/o a que GRK2 (y su ortólogo Gprk2) module la actividad  $\gamma$ -secretasa sólo frente a determinados tipos de sustratos y no frente a otros, al igual que ocurre con otras quinasas (Uemura, 2007). Además, no se ha demostrado la contribución de ninguna mutación de PS en síndromes relacionados con Notch, probablemente debido a que la actividad  $\gamma$ -secretasa está en exceso en comparación con la necesidad de procesamiento de Notch durante la vida adulta (Hass, 2008).

Nuestros datos muestran que la disminución de Gprk2 reduce de forma significativa la señalización que depende de altos niveles de Hh, como Ptc y En, sin afectar prácticamente a la señal que depende de bajos niveles de Hh. Y lo que es también importante, Gprk2 actúa en las células que reciben la señal de Hh y no en las que secretan el ligando. Además, se observa una acumulación de Smo en la membrana plasmática de las células del compartimento anterior deficientes en la quinasa, que no va unida a un aumento de actividad de la ruta. Por tanto, en su conjunto, estos resultados nos están indicando que la función de Gprk2 es necesaria para la transducción de la señal de Hh pero, contrario al efecto de GRK2 en la desensibilización de GPCRs, Gprk2 estaría activando la ruta.

Nosotros proponemos que la función de Gprk2, actuando a través de la cola C-terminal de Smo, está implicada en la activación de la ruta, promoviendo la interacción de Smo con el complejo Costal2/Fused/SuFu para prevenir el procesamiento de Ci en su forma represora, permitiendo así la transcripción de los genes diana (**figura D 4**).

Apesar de que Smo no tiene la capacidad de interaccionar con el ligando Hh, Smo pertenece a la subfamilia secretina de GPCRs, pues presenta una estructura de siete dominios transmembrana y homología de secuencia con esta familia de receptores. Además, al igual que ocurre con ciertos GPCRs, Smo actúa como dímero. La fosforilación de Smo induce un cambio conformacional que favorecería la dimerización de las colas citoplasmáticas de dos moléculas (Zhao, 2007), y la activación de proteínas G heterotriméricas G $\alpha$ i (Riobo, 2006, Ogden, 2008).

El receptor de secretina no es el único de esta familia de receptores que puede ser fosforilado por GRK2 y GRK5. En vertebrados, Smo también puede ser fosforilado por GRK2 (Chen, 2004). Esta fosforilación recluta  $\beta$ -arrestina 2 y promueve la endocitosis de Smo en vesículas recubiertas de clatrina (Chen, 2004; Meloni, 2006). Estudios realizados tanto en pez Cebra como en ratones, publicados en paralelo a esta tesis, ponen de manifiesto la implicación de GRK2 y  $\beta$ -arrestina 2 en la ruta de señalización de Hh (Wilbanks, 2004; Philipp, 2008). En ratones, la supresión de GRK2 causa letalidad embrionaria, la cual ha sido atribuida a un defecto en el desarrollo del corazón. Sin embargo, la letalidad embrionaria del KO constitutivo no puede explicarse solamente por un defecto cardíaco (Matkovich, 2006). Además del fallo en el desarrollo cardíaco, los embriones GRK2 KO presentan múltiples aberraciones en el desarrollo embrionario. Aproximadamente la mitad de los embriones GRK2 KO diseccionados en el día embrionario 11.5 presentan retardo en el crecimiento y en el desarrollo embrionario. Este fenotipo es similar al descrito en modelos de ratón que presentan alterada la ruta de Hh (Chiang, 1996; Zhang, 2004; Kawakami, 2002).



**FIGURA D 4.- PARTICIPACIÓN DE GPRK2 EN LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE HEDGEHOG.**

La unión del ligando Hh a Ptc induce la internalización del complejo Ptc-Hh y la liberación de la inhibición que Ptc ejerce sobre Smo, permitiendo que Smo sea fosforilado por PKA y CKI y que se transloque desde vesículas intracelulares a la membrana plasmática, donde podría tener lugar la fosforilación por Gprk2.

La fosforilación por Gprk2 de la cola citoplasmática de Smo no induce su desensibilización, como ocurre con los GPCRs, sino que dirige la molécula a algún compartimento celular, posiblemente mediante el reclutamiento del homólogo de β-arrestinas (Kurtz), donde Smo señaliza para inducir la expresión de los genes diana de la ruta.

En *Drosophila*, Smo es hiperfosforilado en respuesta a Hh y es en la cola carboxilo terminal donde se localizan los sitios consenso de fosforilación por las quinasas CKI y PKA. Tras realizar un alineamiento de las secuencias de Smo humano y de *Drosophila*, hemos podido comprobar que en esta región, además de los residuos de serina y treonina susceptibles de ser fosforilados por dichas quinasas, existen otros residuos Ser/Thr, próximos a residuos ácidos, que son fosforilados “in vivo” y que podrían ser sustratos de miembros de la familia de GRKs, y que están presentes tanto en humanos como en *Drosophila* (Ruiz-Gómez, 2007). Esto apoyaría nuestros resultados, según los cuales es necesario que Smo sea fosforilado por Gprk2, además de por PKA y CKI, para activar la expresión de sus genes diana. Nuestros resultados indican que la sobre-expresión de la forma mutante de Smo en los sitios de fosforilación por PKA y CKI (Smo<sup>SD123</sup>, Jia 2004) causa un sobre-crecimiento del compartimento anterior y defectos en las venas L2 y L3. La inducción de la expresión de este mutante en todo el disco del ala hace que la expresión de genes diana, como *Ptc* y *En*, se expanda al compartimento anterior, pero la reducción simultánea de Gprk2, aunque no afecta a la expresión del Smo mutante (Smo<sup>SD123</sup>), restringe la expresión de *Ptc* y *En* a sus dominios normales, adyacentes al borde A/P. Esto indica que la inducción de la ruta



## DISCUSIÓN

requiere, además de la fosforilación por PKA y CKI, la fosforilación adicional por Gprk2. Así, Gprk2 parece estar desempeñando en *Drosophila* un papel homólogo al que lleva a cabo GRK2 en vertebrados. La fosforilación de Smo por GRK podría estar conservada en ambas especies.

Dado que la función de GRKs parece estar conservada en vertebrados e invertebrados y puesto que en vertebrados se ha descrito la participación de  $\beta$ -arrestina 2 en la ruta de señalización de Smo (Wilbanks, 2004; Chen, 2004; Kalderon, 2005), parece también interesante estudiar el efecto del homólogo de la arrestina no visual  $\beta$ -arrestina 2 (Kurtz) (Johnson, 2008) en *Drosophila*. El papel de Kurtz en esta ruta podría corroborar nuestra teoría sobre la participación de Gprk2. Además, puesto que hemos generado las armas experimentales necesarias, podremos trasladar el estudio a nivel celular con objeto de caracterizar mejor los pasos que sigue la señal de Hh hasta la inducción de la transcripción de los genes diana.

La ruta de señalización de Hh afecta a la transcripción de múltiples genes diana que participan en el desarrollo de numerosos tejidos y órganos (Mc Mahon, 2003). Un efecto dramático de la reducción de Hh en embriones humanos es la ciclopia (formación de un solo ojo), que es una forma de holoprosencefalia. En adultos, la señal de Hh dirige la formación y persistencia de poblaciones de células precursoras (Baron, 2003; Machold, 2003; Palma, 2004; Maye, 2004). El aumento de la señal de Hh en algunos órganos induce la generación de tumores en la piel, cerebelo, músculo, tracto digestivo, páncreas o próstata (Pasca di Magliano, 2003).

Se ha descrito que la señal de Shh anula el efecto supresor de tumores de p53 por activación de Mdm2 (Abe, 2008). La distribución subcelular de Mdm2 está fuertemente regulada y su alteración tiene distintas consecuencias fisiológicas. La ubiquitilación y degradación de p53 por Mdm2 tiene lugar en el núcleo. Por tanto, la señal de Shh estaría favoreciendo la localización nuclear de Mdm2 y, por consiguiente, la degradación de p53 en detrimento de sustratos citosólicos, como se ha descrito en el laboratorio para GRK2 en respuesta a la activación del eje PI3K/ Akt (Salcedo, 2006), que favorece la estabilización de la quinasa. Puesto que GRK2, a su vez, modula la ruta de Shh en vertebrados, es tentador sugerir que en estas circunstancias se estaría produciendo un fenómeno de retroalimentación que induciría el desarrollo de tumores en un proceso dependiente de Shh. De hecho, se ha descrito que la presencia de GRK2 coopera sinérgicamente con la capacidad de Smo de inducir focos en células C3H10T1/2 (Meloni, 2006). Por otro lado, la disminución de GRK2 impide la señalización de Smo e incluso de sus variantes oncogénicas.

Además, se ha descrito que en astrocitos el papel de Shh depende de la Ser/Thr quinasa p38 vía GRK2, siendo esencial la actividad de GRK2 en la regulación de la transcripción mediada por Shh en este tipo celular (Atkinson, 2009). Esto podría estar implicando a la ruta de Hh en procesos celulares diferentes como estrés, inflamación y diferenciación, procesos descritos previamente para p38 (Peregrín, 2006; Mayor, 2007). Todo ello deberá ser investigado en el futuro.

Gprk2 parece, por tanto, desempeñar en *Drosophila* funciones análogas a GRK2 en vertebrados. En su conjunto, nuestros resultados indican que es necesario que Smo sea fosforilado por Gprk2, además de por PKA y CKI, para desempeñar su función. Gprk2 parece estar induciendo, posiblemente mediante el reclutamiento de un homólogo de  $\beta$ -arrestinas, la internalización de Smo a compartimentos celulares internos donde interacciona con el complejo Costal2/Fused/Su(fu), previniendo el procesamiento de Ci y, por tanto, permitiendo que Ci<sup>155</sup> se transloque al núcleo para inducir la expresión de los genes diana de la ruta (figura D 4).

Por tanto, un estudio profundo de la función y modulación de Gprk2 nos puede ayudar a caracterizar mejor la ruta de Hedgehog y a comprender mejor procesos fundamentales que tienen lugar en vertebrados.



## CONCLUSIONES



1.- La proteína sensora de calcio DREAM/calsenilina/KChIP3 interacciona con y es sustrato de distintos miembros de la familia de quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs), siendo especialmente buen sustrato de GRK2. La aproximación proteómica y la posterior confirmación por mutagénesis permiten afirmar que el residuo S95 de DREAM es el sitio preferente de fosforilación por GRK2.

2.- La sustitución de la S95 de DREAM por un ácido aspártico, que mimetiza el estado fosforilado de la proteína, no afecta a su actividad transcripcional pero disminuye su capacidad de modular las propiedades y la localización en la membrana plasmática de los canales de potasio dependientes de voltaje Kv4, sin afectar a la tetramerización de los mismos.

3.- La inhibición de calcineurina, fosfatasa capaz de desfosforilar "in vitro" DREAM fosforilado por GRK2, bloquea la expresión de corriente y la localización en la membrana de los canales Kv4.2. El proceso de fosforilación/desfosforilación de DREAM mediado por GRK2 y calcineurina, respectivamente, regula el tráfico de los canales Kv4 a la membrana.

4.- GRK2 interacciona "in vitro" con el dominio carboxilo terminal y el bucle citoplasmático de PS1, siendo capaz de fosforilar este último. La interacción GRK2/PS1 también tiene lugar de forma endógena dentro de la célula y está favorecida por la activación e internalización del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico. La fosforilación de GRK2 por ERK y c-Src también promueve la interacción.

5.- La sobre-expresión de GRK2 y no de su mutante catalíticamente inactivo (GRK2<sub>K220R</sub>) conlleva un aumento de la degradación de PS1 no procesada por la vía del proteasoma, hecho que se ve corroborado por el aumento de los niveles de los fragmentos PS1-NTF y PS1-CTF en ratones heterocigotos para GRK2. La fosforilación de PS1 procesada por GRK2 aumenta la actividad  $\gamma$ -secretasa de PS1 frente al APP, probablemente de forma modulada por el estado de fosforilación de la quinasa por c-Src y ERK.

6.- La expresión de altos niveles de *Gprk2* en *Drosophila* está regulada por la ruta de Hedgehog, observándose un mayor nivel de expresión en las células anteriores del borde A/P del disco imaginal del ala.

7.- *Gprk2* participa en la ruta de señalización de Hedgehog. La disminución de los niveles de *Gprk2* en el disco de ala reduce eficientemente la señal que responde a altos niveles de Hh, sin afectar prácticamente a la señal que responde a bajos niveles.

8.- La actividad de *Gprk2* es requerida para la transducción de la señal de Hh en las células receptoras y no para la secreción del ligando. La falta de *Gprk2* afecta a la actividad y la internalización del receptor Smoothed (Smo).

9.- Los mutantes de delección de Smo y la deficiencia de *Gprk2* cooperan sinérgicamente provocando un fenotipo fuerte de pérdida de función de Hh, comparable a la eliminación de Smo, lo que sugiere que *Gprk2* funciona, probablemente, fosforilando el dominio carboxilo terminal de Smo.



## BIBLIOGRAFÍA





Abe, Y. et al. Hedgehog signaling overrides p53-mediated tumor suppression by activating Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 4838-43 (2008).

Adams, M. D. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-95 (2000).

Affolter, M. et al. The *Drosophila* SRF homolog is expressed in a subset of tracheal cells and maps within a genomic region required for tracheal development. *Development* 120, 743-53 (1994).

Aikin, R. A., Ayers, K. L. & Therond, P. P. The role of kinases in the Hedgehog signalling pathway. *EMBO Rep* 9, 330-6 (2008).

Alberici, A. et al. Presenilin 1 protein directly interacts with Bcl-2. *J Biol Chem* 274, 30764-9 (1999).

Amanai, K. & Jiang, J. Distinct roles of Central missing and Dispatched in sending the Hedgehog signal. *Development* 128, 5119-27 (2001).

Ammon-Treiber, S. & Holtt, V. Morphine-induced changes of gene expression in the brain. *Addict Biol* 10, 81-9 (2005).

An, W. F. et al. Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* 403, 553-6 (2000).

Annaert, W. G. et al. Presenilin 1 controls gamma-secretase processing of amyloid precursor protein in pre-golgi compartments of hippocampal neurons. *J Cell Biol* 147, 277-94 (1999).

Annaert, W. G. et al. Interaction with telencephalin and the amyloid precursor protein predicts a ring structure for presenilins. *Neuron* 32, 579-89 (2001).

Apionishev, S., Katanayeva, N. M., Marks, S. A., Kalderon, D. & Tomlinson, A. *Drosophila* Smoothened phosphorylation sites essential for Hedgehog signal transduction. *Nat Cell Biol* 7, 86-92 (2005).

Aragay, A. M. et al. G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2): mechanisms of regulation and physiological functions. *FEBS Lett* 430, 37-40 (1998).

Arasada, R. R. & Carpenter, G. Secretase-dependent tyrosine phosphorylation of Mdm2 by the ErbB-4 intracellular domain fragment. *J Biol Chem* 280, 30783-7 (2005).

Arawaka, S. et al. The levels of mature glycosylated nicastrin are regulated and correlate with gamma-secretase processing of amyloid beta-precursor protein. *J Neurochem* 83, 1065-71 (2002).

Ashburner, M. & Gubb, D. Chaotic names. *Nature* 339, 264 (1989).

Atkinson, P. J. et al. Sonic Hedgehog signaling in astrocytes is dependent on p38 mitogen-activated protein kinase and G-protein receptor kinase 2. *J Neurochem* 108, 1539-49 (2009).

Aza-Blanc, P., Ramirez-Weber, F. A., Laget, M. P., Schwartz, C. & Kornberg, T. B. Proteolysis that is inhibited

## BIBLIOGRAFÍA

---

by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell* 89, 1043-53 (1997).

**B**aldwin, J. M. The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *Embo J* 12, 1693-703 (1993).

Barnes, M. R., Duckworth, D. M. & Beeley, L. J. Frizzled proteins constitute a novel family of G protein-coupled receptors, most closely related to the secretin family. *Trends Pharmacol Sci* 19, 399-400 (1998).

Baron, M. H. Embryonic origins of mammalian hematopoiesis. *Exp Hematol* 31, 1160-9 (2003).

Beachy, P. A., Karhadkar, S. S. & Berman, D. M. Mending and malignancy. *Nature* 431, 402 (2004).

Benovic, J. L., Mayor, F., Jr., Somers, R. L., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. Light-dependent phosphorylation of rhodopsin by beta-adrenergic receptor kinase. *Nature* 321, 869-72 (1986).

Benovic, J. L. et al. Agonist-dependent phosphorylation of the alpha 2-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* 262, 17251-3 (1987).

Benovic, J. L., Stone, W. C., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. Inhibition of the beta-adrenergic receptor kinase by polyanions. *J Biol Chem* 264, 6707-10 (1989).

Bergman, A., Laudon, H., Winblad, B., Lundkvist, J. & Naslund, J. The extreme C terminus of presenilin 1 is essential for gamma-secretase complex assembly and activity. *J Biol Chem* 279, 45564-72 (2004).

Bernard, C. et al. Acquired dendritic channelopathy in temporal lobe epilepsy. *Science* 305, 532-5 (2004).

Bezprozvanny, I. & Mattson, M. P. Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 31, 454-63 (2008).

Blair, S. S., Brower, D. L., Thomas, J. B. & Zavortink, M. The role of apterous in the control of dorsoventral compartmentalization and PS integrin gene expression in the developing wing of *Drosophila*. *Development* 120, 1805-15 (1994).

Boulton, M. E., Cai, J. & Grant, M. B. gamma-Secretase: a multifaceted regulator of angiogenesis. *J Cell Mol Med* 12, 781-95 (2008).

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54 (1976).

Brand, A. H. & Perrimon, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-15 (1993).

Bray, S. J. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 678-89 (2006).

Bristow, M. R. et al. Beta-adrenergic pathways in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Circulation*

82, 112-25 (1990).

Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B. & Goldstein, J. L. Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100, 391-8 (2000).

Brunkan, A. L. & Goate, A. M. Presenilin function and gamma-secretase activity. *J Neurochem* 93, 769-92 (2005).

Brunkan, A. L., Martinez, M., Walker, E. S. & Goate, A. M. Presenilin endoproteolysis is an intramolecular cleavage. *Mol Cell Neurosci* 29, 65-73 (2005).

Burgoyne, R. D. & Weiss, J. L. The neuronal calcium sensor family of  $\text{Ca}^{2+}$ -binding proteins. *Biochem J* 353, 1-12 (2001).

Burgoyne, R. D. Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal  $\text{Ca}^{2+}$  signalling. *Nat Rev Neurosci* 8, 182-93 (2007).

Burke, R. et al. Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell* 99, 803-15 (1999).

Buxbaum, J. D. et al. Calsenilin: a calcium-binding protein that interacts with the presenilins and regulates the levels of a presenilin fragment. *Nat Med* 4, 1177-81 (1998).

Cant, S. H. & Pitcher, J. A. G protein-coupled receptor kinase 2-mediated phosphorylation of ezrin is required for G protein-coupled receptor-dependent reorganization of the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 16, 3088-99 (2005).

Capell, A. et al. The proteolytic fragments of the Alzheimer's disease-associated presenilin-1 form heterodimers and occur as a 100-150-kDa molecular mass complex. *J Biol Chem* 273, 3205-11 (1998).

Capell, A. et al. Nicastrin interacts with gamma-secretase complex components via the N-terminal part of its transmembrane domain. *J Biol Chem* 278, 52519-23 (2003).

Capell, A. et al. Gamma-secretase complex assembly within the early secretory. *J Biol Chem* 280, 6471-8 (2005).

Carman, C. V., Som, T., Kim, C. M. & Benovic, J. L. Binding and phosphorylation of tubulin by G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem* 273, 20308-16 (1998).

Carman, C. V. et al. Selective regulation of  $\text{G}\alpha(\text{q}/11)$  by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J Biol Chem* 274, 34483-92 (1999).

Carman, C. V. et al. Mutational analysis of  $\text{G}\beta\text{tagamma}$  and phospholipid interaction with G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem* 275, 10443-52 (2000).

Carrion, A. M., Link, W. A., Ledo, F., Mellstrom, B. & Naranjo, J. R. DREAM is a  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated transcriptional repressor. *Nature* 398, 80-4 (1999).

Cassill, J. A., Whitney, M., Joazeiro, C. A., Becker, A. & Zuker, C. S. Isolation of *Drosophila* genes encoding G

## BIBLIOGRAFÍA

---

protein-coupled receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 11067-70 (1991).

Chen, F. et al. TMP21 is a presenilin complex component that modulates gamma-secretase but not epsilon-secretase activity. *Nature* 440, 1208-12 (2006).

Chen, M. H., Li, Y. J., Kawakami, T., Xu, S. M. & Chuang, P. T. Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates. *Genes Dev* 18, 641-59 (2004).

Chen, W. et al. Activity-dependent internalization of smoothened mediated by beta-arrestin 2 and GRK2. *Science* 306, 2257-60 (2004).

Chen, Y. & Struhl, G. Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* 87, 553-63 (1996).

Chen, Y. et al. EGF regulates opioid receptors through EGFR-mediated GRK2 phosphorylation and activation. *Mol Biol Cell* 19, 2973-83 (2008).

Chiang, C. et al. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383, 407-13 (1996).

Choi, E. K. et al. Calsenilin is a substrate for caspase-3 that preferentially interacts with the familial Alzheimer's disease-associated C-terminal fragment of presenilin 2. *J Biol Chem* 276, 19197-204 (2001).

Chuang, T. T., LeVine, H., 3rd & De Blasi, A. Phosphorylation and activation of beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *J Biol Chem* 270, 18660-5 (1995).

Chyung, J. H., Raper, D. M. & Selkoe, D. J. Gamma-secretase exists on the plasma membrane as an intact complex that accepts substrates and effects intramembrane cleavage. *J Biol Chem* 280, 4383-92 (2005).

Cobelens, P. M. et al. Hydrogen peroxide impairs GRK2 translation via a calpain-dependent and cdk1-mediated pathway. *Cell Signal* 19, 269-77 (2007).

Cong, M. et al. Regulation of membrane targeting of the G protein-coupled receptor kinase 2 by protein kinase A and its anchoring protein AKAP79. *J Biol Chem* 276, 15192-9 (2001).

Corbit, K. C. et al. Vertebrate Smoothened functions at the primary cilium. *Nature* 437, 1018-21 (2005).

Crozatier, M., Glise, B. & Vincent, A. Connecting Hh, Dpp and EGF signalling in patterning of the *Drosophila* wing; the pivotal role of *collier/knot* in the AP organiser. *Development* 129, 4261-9 (2002).

Daaka, Y. et al. Receptor and G betagamma isoform-specific interactions with G protein-coupled receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2180-5 (1997).

Dahmann, C. & Basler, K. Compartment boundaries: at the edge of development. *Trends Genet* 15, 320-6 (1999).

Dai, P., Akimaru, H. & Ishii, S. A hedgehog-responsive region in the *Drosophila* wing disc is defined by debra-

mediated ubiquitination and lysosomal degradation of Ci. *Dev Cell* 4, 917-28 (2003).

Dann, C. E. et al. Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature* 412, 86-90 (2001).

De Blasi, A., Parruti, G. & Sallese, M. Regulation of G protein-coupled receptor kinase subtypes in activated T lymphocytes. Selective increase of beta-adrenergic receptor kinase 1 and 2. *J Clin Invest* 95, 203-10 (1995).

de Celis, J. F., Garcia-Bellido, A. & Bray, S. J. Activation and function of Notch at the dorsal-ventral boundary of the wing imaginal disc. *Development* 122, 359-69 (1996).

de Celis, J. F., Barrio, R. & Kafatos, F. C. Regulation of the spalt/spalt-related gene complex and its function during sensory organ development in the *Drosophila* thorax. *Development* 126, 2653-62 (1999).

DeBurman, S. K. et al. Lipid-mediated regulation of G protein-coupled receptor kinases 2 and 3. *J Biol Chem* 270, 5742-7 (1995).

DeBurman, S. K., Ptasienski, J., Benovic, J. L. & Hosey, M. M. G protein-coupled receptor kinase GRK2 is a phospholipid-dependent enzyme that can be conditionally activated by G protein betagamma subunits. *J Biol Chem* 271, 22552-62 (1996).

Denef, N., Neubuser, D., Perez, L. & Cohen, S. M. Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothened. *Cell* 102, 521-31 (2000).

DeWire, S. M., Ahn, S., Lefkowitz, R. J. & Shenoy, S. K. Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol* 69, 483-510 (2007).

Dewji, N. N. The structure and functions of the presenilins. *Cell Mol Life Sci* 62, 1109-19 (2005).

Diaz-Benjumea, F. J. & Cohen, S. M. Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*. *Cell* 75, 741-52 (1993).

Diaz-Benjumea, F. J. & Cohen, S. M. Serrate signals through Notch to establish a Wingless-dependent organizer at the dorsal/ventral compartment boundary of the *Drosophila* wing. *Development* 121, 4215-25 (1995).

Dinudom, A. et al. The kinase Grk2 regulates Nedd4/Nedd4-2-dependent control of epithelial Na<sup>+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11886-90 (2004).

Doan, A. et al. Protein topology of presenilin 1. *Neuron* 17, 1023-30 (1996).

Doherty, D., Feger, G., Younger-Shepherd, S., Jan, L. Y. & Jan, Y. N. Delta is a ventral to dorsal signal complementary to Serrate, another Notch ligand, in *Drosophila* wing formation. *Genes Dev* 10, 421-34 (1996).

Dorn, G. W., 2nd, Tepe, N. M., Wu, G., Yatani, A. & Liggett, S. B. Mechanisms of impaired beta-adrenergic receptor signaling in G(alphaq)-mediated cardiac hypertrophy and ventricular dysfunction. *Mol Pharmacol* 57, 278-87 (2000).

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Dorn, G. W., 2nd. GRK mythology: G-protein receptor kinases in cardiovascular disease. *J Mol Med* (2009).
- Dorsam, R. T. & Gutkind, J. S. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 7, 79-94 (2007).
- Dries, D. R. & Yu, G. Assembly, maturation, and trafficking of the gamma-secretase complex in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 5, 132-46 (2008).
- Dzimiri, N., Muiya, P., Andres, E. & Al-Halees, Z. Differential functional expression of human myocardial G protein receptor kinases in left ventricular cardiac diseases. *Eur J Pharmacol* 489, 167-77 (2004).
- Eaton, S. & Kornberg, T. B. Repression of ci-D in posterior compartments of *Drosophila* by engrailed. *Genes Dev* 4, 1068-77 (1990).
- Edbauer, D., Winkler, E., Haass, C. & Steiner, H. Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid beta-peptide production via complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8666-71 (2002).
- Edbauer, D. et al. Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* 5, 486-8 (2003).
- Eichmann, T. et al. The amino-terminal domain of G-protein-coupled receptor kinase 2 is a regulatory Gbeta gamma binding site. *J Biol Chem* 278, 8052-7 (2003).
- Elorza, A., Sarnago, S. & Mayor, F., Jr. Agonist-dependent modulation of G protein-coupled receptor kinase 2 by mitogen-activated protein kinases. *Mol Pharmacol* 57, 778-83 (2000).
- Elorza, A., Penela, P., Sarnago, S. & Mayor, F., Jr. MAPK-dependent degradation of G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem* 278, 29164-73 (2003).
- Erdtmann-Vourliotis, M., Mayer, P., Ammon, S., Riechert, U. & Holtt, V. Distribution of G-protein-coupled receptor kinase (GRK) isoforms 2, 3, 5 and 6 mRNA in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 95, 129-37 (2001).
- Feldman, R. D. Deactivation of vasodilator responses by GRK2 overexpression: a mechanism or the mechanism for hypertension? *Mol Pharmacol* 61, 707-9 (2002).
- Ferguson, S. S. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53, 1-24 (2001).
- Flajolet, M. et al. Regulation of Alzheimer's disease amyloid-beta formation by casein kinase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4159-64 (2007).
- Fluhrer, R., Friedlein, A., Haass, C. & Walter, J. Phosphorylation of presenilin 1 at the caspase recognition site regulates its proteolytic processing and the progression of apoptosis. *J Biol Chem* 279, 1585-93 (2004).
- Foord, S. M., Jupe, S. & Holbrook, J. Bioinformatics and type II G-protein-coupled receptors. *Biochem Soc Trans* 30, 473-9 (2002).
- Fraering, P. C. et al. Purification and characterization of the human gamma-secretase complex. *Biochemistry* 43,



9774-89 (2004).

Francis, R. et al. aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell* 3, 85-97 (2002).

Freedman, N. J. et al. Phosphorylation of the platelet-derived growth factor receptor-beta and epidermal growth factor receptor by G protein-coupled receptor kinase-2. Mechanisms for selectivity of desensitization. *J Biol Chem* 277, 48261-9 (2002).

Freeman, J. L. et al. Beta 2-adrenergic receptor stimulated, G protein-coupled receptor kinase 2 mediated, phosphorylation of ribosomal protein P2. *Biochemistry* 41, 12850-7 (2002).

Gainetdinov, R. R. et al. Dopaminergic supersensitivity in G protein-coupled receptor kinase 6-deficient mice. *Neuron* 38, 291-303 (2003).

Gallet, A. & Therond, P. P. Temporal modulation of the Hedgehog morphogen gradient by a patched-dependent targeting to lysosomal compartment. *Dev Biol* 277, 51-62 (2005).

Gallet, A., Ruel, L., Staccini-Lavenant, L. & Therond, P. P. Cholesterol modification is necessary for controlled planar long-range activity of Hedgehog in *Drosophila* epithelia. *Development* 133, 407-18 (2006).

Gan, X. et al. Involvement of the C-terminal proline-rich motif of G protein-coupled receptor kinases in recognition of activated rhodopsin. *J Biol Chem* 279, 49741-6 (2004).

Garcia-Higuera, I. et al. Association of the regulatory beta-adrenergic receptor kinase with rat liver microsomal membranes. *J Biol Chem* 269, 1348-55 (1994).

Gomez-Skarmeta, J. L., Diez del Corral, R., de la Calle-Mustienes, E., Ferre-Marco, D. & Modolell, J. Araucan and caupolican, two members of the novel iroquois complex, encode homeoproteins that control proneural and vein-forming genes. *Cell* 85, 95-105 (1996).

Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G. & Weiss, W. Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. *Electrophoresis* 20, 712-7 (1999).

Goriely, A., Dumont, N., Dambly-Chaudiere, C. & Ghysen, A. The determination of sense organs in *Drosophila*: effect of the neurogenic mutations in the embryo. *Development* 113, 1395-404 (1991).

Goutte, C., Tsunozaki, M., Hale, V. A. & Priess, J. R. APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 775-9 (2002).

Gros, R. et al. G-protein-coupled receptor kinase expression in hypertension. *Clin Pharmacol Ther* 65, 545-51 (1999).

Gros, R. et al. G-Protein-coupled receptor kinase activity in hypertension: increased vascular and lymphocyte G-protein receptor kinase-2 protein expression. *Hypertension* 35, 38-42 (2000).

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Grunberg, J. et al. Alzheimer's disease associated presenilin-1 holoprotein and its 18-20 kDa C-terminal fragment are death substrates for proteases of the caspase family. *Biochemistry* 37, 2263-70 (1998).
- Gu, Y. et al. APH-1 interacts with mature and immature forms of presenilins and nicastrin and may play a role in maturation of presenilin.nicastrin complexes. *J Biol Chem* 278, 7374-80 (2003).
- Hasdemir, B., Fitzgerald, D. J., Prior, I. A., Tepikin, A. V. & Burgoyne, R. D. Traffic of Kv4 K<sup>+</sup> channels mediated by KChIP1 is via a novel post-ER vesicular pathway. *J Cell Biol* 171, 459-69 (2005).
- Hass, M. R., Sato, C., Kopan, R. & Zhao, G. Presenilin: RIP and beyond. *Semin Cell Dev Biol* (2008).
- Hayashi, I. et al. Selective reconstitution and recovery of functional gamma-secretase complex on budded baculovirus particles. *J Biol Chem* 279, 38040-6 (2004).
- Hebert, S. S. et al. Coordinated and widespread expression of gamma-secretase in vivo: evidence for size and molecular heterogeneity. *Neurobiol Dis* 17, 260-72 (2004).
- Herreman, A. et al. Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11872-7 (1999).
- Hildreth, K. L. et al. Phosphorylation of the platelet-derived growth factor receptor-beta by G protein-coupled receptor kinase-2 reduces receptor signaling and interaction with the Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger regulatory factor. *J Biol Chem* 279, 41775-82 (2004).
- Ho, J. et al. The G protein-coupled receptor kinase-2 is a TGFbeta-inducible antagonist of TGFbeta signal transduction. *Embo J* 24, 3247-58 (2005).
- Ho, J., Chen, H. & Lebrun, J. J. Novel dominant negative Smad antagonists to TGFbeta signaling. *Cell Signal* 19, 1565-74 (2007).
- Hoffman, D. A., Magee, J. C., Colbert, C. M. & Johnston, D. K<sup>+</sup> channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature* 387, 869-75 (1997).
- Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J. & Rao, A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17, 2205-32 (2003).
- Honda, T. et al. Dual roles of proteasome in the metabolism of presenilin 1. *J Neurochem* 72, 255-61 (1999).
- Hooper, J. E. & Scott, M. P. Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 306-17 (2005).
- Hu, Y. & Fortini, M. E. Different cofactor activities in gamma-secretase assembly: evidence for a nicastrin-Aph-1 subcomplex. *J Cell Biol* 161, 685-90 (2003).
- Hu, H. J. et al. The kv4.2 potassium channel subunit is required for pain plasticity. *Neuron* 50, 89-100 (2006).

- Iaccarino, G., Tomhave, E. D., Lefkowitz, R. J. & Koch, W. J. Reciprocal in vivo regulation of myocardial G protein-coupled receptor kinase expression by beta-adrenergic receptor stimulation and blockade. *Circulation* 98, 1783-9 (1998).
- Ingham, P. W. & McMahon, A. P. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 15, 3059-87 (2001).
- Irvine, K. D. & Wieschaus, E. *fringe*, a Boundary-specific signaling molecule, mediates interactions between dorsal and ventral cells during *Drosophila* wing development. *Cell* 79, 595-606 (1994).
- Isoo, N. et al. Abeta42 overproduction associated with structural changes in the catalytic pore of gamma-secretase: common effects of Pen-2 N-terminal elongation and fenofibrate. *J Biol Chem* 282, 12388-96 (2007).
- Jaber, M. et al. Essential role of beta-adrenergic receptor kinase 1 in cardiac development and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12974-9 (1996).
- Jia, J., Tong, C. & Jiang, J. Smoothed transduces Hedgehog signal by physically interacting with Costal2/Fused complex through its C-terminal tail. *Genes Dev* 17, 2709-20 (2003).
- Jia, J., Tong, C., Wang, B., Luo, L. & Jiang, J. Hedgehog signalling activity of Smoothed requires phosphorylation by protein kinase A and casein kinase I. *Nature* 432, 1045-50 (2004).
- Jimenez-Sainz, M. C. et al. G protein-coupled receptor kinase 2 negatively regulates chemokine signaling at a level downstream from G protein subunits. *Mol Biol Cell* 17, 25-31 (2006).
- Jo, D. G. et al. Pro-apoptotic function of calsenilin/DREAM/KChIP3. *Faseb J* 15, 589-91 (2001).
- Jo, D. G., Chang, J. W., Hong, H. S., Mook-Jung, I. & Jung, Y. K. Contribution of presenilin/gamma-secretase to calsenilin-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 305, 62-6 (2003).
- Jo, D. G. et al. Induction of pro-apoptotic calsenilin/DREAM/KChIP3 in Alzheimer's disease and cultured neurons after amyloid-beta exposure. *J Neurochem* 88, 604-11 (2004).
- Johnson, E. C., Tift, F. W., McCauley, A., Liu, L. & Roman, G. Functional characterization of kurtz, a *Drosophila* non-visual arrestin, reveals conservation of GPCR desensitization mechanisms. *Insect Biochem Mol Biol* 38, 1016-22 (2008).
- Kabbani, N., Negyessy, L., Lin, R., Goldman-Rakic, P. & Levenson, R. Interaction with neuronal calcium sensor NCS-1 mediates desensitization of the D2 dopamine receptor. *J Neurosci* 22, 8476-86 (2002).
- Kaether, C. et al. The presenilin C-terminus is required for ER-retention, nicastrin-binding and gamma-secretase activity. *Embo J* 23, 4738-48 (2004).
- Kaether, C. et al. Endoplasmic reticulum retention of the gamma-secretase complex component Pen2 by Rer1. *EMBO Rep* 8, 743-8 (2007).

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Kalderon, D. The mechanism of hedgehog signal transduction. *Biochem Soc Trans* 33, 1509-12 (2005).
- Kalderon, D. Hedgehog signaling: a smoothened conformational switch. *Curr Biol* 18, R64-6 (2008).
- Kanning, K. C. et al. Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor and two homologs generates C-terminal fragments with signaling capability. *J Neurosci* 23, 5425-36 (2003).
- Kawakami, T. et al. Mouse dispatched mutants fail to distribute hedgehog proteins and are defective in hedgehog signaling. *Development* 129, 5753-65 (2002).
- Kennerdell, J. R. & Carthew, R. W. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* 95, 1017-26 (1998).
- Keys, J. R., Zhou, R. H., Harris, D. M., Druckman, C. A. & Eckhart, A. D. Vascular smooth muscle overexpression of G protein-coupled receptor kinase 5 elevates blood pressure, which segregates with sex and is dependent on Gi-mediated signaling. *Circulation* 112, 1145-53 (2005).
- Kim, D. Y., Ingano, L. A. & Kovacs, D. M. Nectin-1alpha, an immunoglobulin-like receptor involved in the formation of synapses, is a substrate for presenilin/gamma-secretase-like cleavage. *J Biol Chem* 277, 49976-81 (2002).
- Kim, S. H., Ikeuchi, T., Yu, C. & Sisodia, S. S. Regulated hyperaccumulation of presenilin-1 and the "gamma-secretase" complex. Evidence for differential intramembranous processing of transmembrane substrates. *J Biol Chem* 278, 33992-4002 (2003).
- Kim, T. W. et al. Endoproteolytic cleavage and proteasomal degradation of presenilin 2 in transfected cells. *J Biol Chem* 272, 11006-10 (1997).
- Kimberly, W. T. et al. Complex N-linked glycosylated nicastrin associates with active gamma-secretase and undergoes tight cellular regulation. *J Biol Chem* 277, 35113-7 (2002).
- Kimberly, W. T. et al. Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6382-7 (2003).
- Kirschenbaum, F. et al. Substitution of a glycogen synthase kinase-3beta phosphorylation site in presenilin 1 separates presenilin function from beta-catenin. *J Biol Chem* 276, 7366-75 (2001).
- Kirschenbaum, F., Hsu, S. C., Cordell, B. & McCarthy, J. V. Glycogen synthase kinase-3beta regulates presenilin 1 C-terminal fragment levels. *J Biol Chem* 276, 30701-7 (2001).
- Klee, C. B. Concerted regulation of protein phosphorylation and dephosphorylation by calmodulin. *Neurochem Res* 16, 1059-65 (1991).
- Koch, W. J., Inglese, J., Stone, W. C. & Lefkowitz, R. J. The binding site for the beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on the beta-adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* 268, 8256-60 (1993).

- Kohout, T. A. & Lefkowitz, R. J. Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol Pharmacol* 63, 9-18 (2003).
- Kornberg, T., Siden, I., O'Farrell, P. & Simon, M. The engrailed locus of *Drosophila*: in situ localization of transcripts reveals compartment-specific expression. *Cell* 40, 45-53 (1985).
- Kong, G., Penn, R. & Benovic, J. L. A beta-adrenergic receptor kinase dominant negative mutant attenuates desensitization of the beta 2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 269, 13084-7 (1994).
- Kozasa, T. Regulation of G protein-mediated signal transduction by RGS proteins. *Life Sci* 68, 2309-17 (2001).
- Krasel, C. et al. Phosphorylation of GRK2 by protein kinase C abolishes its inhibition by calmodulin. *J Biol Chem* 276, 1911-5 (2001).
- Kunjilwar, K., Strang, C., DeRubeis, D. & Pfaffinger, P. J. KChIP3 rescues the functional expression of Shal channel tetramerization mutants. *J Biol Chem* 279, 54542-51 (2004).
- Kuo, L. H. et al. Tumor necrosis factor-alpha-elicited stimulation of gamma-secretase is mediated by c-Jun N-terminal kinase-dependent phosphorylation of presenilin and nicastrin. *Mol Biol Cell* 19, 4201-12 (2008).
- Laemmli, U. K., Beguin, F. & Gujer-Kellenberger, G. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol* 47, 69-85 (1970).
- LaFerla, F. M. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 3, 862-72 (2002).
- Lai, M. T. et al. Presenilin-1 and presenilin-2 exhibit distinct yet overlapping gamma-secretase activities. *J Biol Chem* 278, 22475-81 (2003).
- Lannutti, B. J. & Schneider, L. E. Gprk2 controls cAMP levels in *Drosophila* development. *Dev Biol* 233, 174-85 (2001).
- Lau, K. F. et al. Cyclin-dependent kinase-5/p35 phosphorylates Presenilin 1 to regulate carboxy-terminal fragment stability. *Mol Cell Neurosci* 20, 13-20 (2002).
- Laudon, H. et al. A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. *J Biol Chem* 280, 35352-60 (2005).
- Laudon, H., Winblad, B., Naslund, J. The Alzheimer's disease associated g-secretase complex: functional domains in the presenilin1 protein. *Physiol Behav* 92, 115-20 (2007).
- LaVoie, M. J. et al. Assembly of the gamma-secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin. *J Biol Chem* 278, 37213-22 (2003).
- LaVoie, M. J. & Selkoe, D. J. The Notch ligands, Jagged and Delta, are sequentially processed by alpha-secretase and presenilin/gamma-secretase and release signaling fragments. *J Biol Chem* 278, 34427-37 (2003).

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Lawrence, P. A. & Morata, G. Developmental biology. Lighting up *Drosophila*. *Nature* 356, 107-8 (1992).
- Ledo, F. et al. The DREAM-DRE interaction: key nucleotides and dominant negative mutants. *Biochim Biophys Acta* 1498, 162-8 (2000).
- Ledo, F., Kremer, L., Mellstrom, B. & Naranjo, J. R. Ca<sup>2+</sup>-dependent block of CREB-CBP transcription by repressor DREAM. *Embo J* 21, 4583-92 (2002).
- Lee, H. J. et al. Presenilin-dependent gamma-secretase-like intramembrane cleavage of ErbB4. *J Biol Chem* 277, 6318-23 (2002).
- Lee, J. D. & Treisman, J. E. Sightless has homology to transmembrane acyltransferases and is required to generate active Hedgehog protein. *Curr Biol* 11, 1147-52 (2001).
- Lee, Y. S. & Carthew, R. W. Making a better RNAi vector for *Drosophila*: use of intron spacers. *Methods* 30, 322-9 (2003).
- Lefkowitz, R. J. & Whalen, E. J. beta-arrestins: traffic cops of cell signaling. *Curr Opin Cell Biol* 16, 162-8 (2004).
- Lefkowitz, R. J. & Shenoy, S. K. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308, 512-7 (2005).
- Leissring, M. A. et al. Calsenilin reverses presenilin-mediated enhancement of calcium signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8590-3 (2000).
- Leosco, D. et al. Lymphocyte G-protein-coupled receptor kinase-2 is upregulated in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 415, 279-82 (2007).
- Levine, A. J., Finlay, C. A. & Hinds, P. W. P53 is a tumor suppressor gene. *Cell* 116, S67-9 (2004).
- Levitan, D. et al. PS1 N- and C-terminal fragments form a complex that functions in APP processing and Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12186-90 (2001).
- Li, X. & Greenwald, I. Additional evidence for an eight-transmembrane-domain topology for *Caenorhabditis elegans* and human presenilins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7109-14 (1998).
- Li, Y. M. et al. Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6138-43 (2000).
- Lilliehook, C. et al. Calsenilin enhances apoptosis by altering endoplasmic reticulum calcium signaling. *Mol Cell Neurosci* 19, 552-9 (2002).
- Lilliehook, C. et al. Altered Aβ formation and long-term potentiation in a calsenilin knock-out. *J Neurosci* 23, 9097-106 (2003).
- Link, W. A. et al. Day-night changes in downstream regulatory element antagonist modulator/potassium channel interacting protein activity contribute to circadian gene expression in pineal gland. *J Neurosci* 24, 5346-55 (2004).



- Lisman, J., Schulman, H. & Cline, H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci* 3, 175-90 (2002).
- Liu, S., Premont, R. T., Kontos, C. D., Zhu, S. & Rockey, D. C. A crucial role for GRK2 in regulation of endothelial cell nitric oxide synthase function in portal hypertension. *Nat Med* 11, 952-8 (2005).
- Lodowski, D. T. et al. The role of G beta gamma and domain interfaces in the activation of G protein-coupled receptor kinase 2. *Biochemistry* 44, 6958-70 (2005).
- Loetscher, H. et al. Presenilins are processed by caspase-type proteases. *J Biol Chem* 272, 20655-9 (1997).
- Lombardi, M. S. et al. Decreased expression and activity of G-protein-coupled receptor kinases in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis. *Faseb J* 13, 715-25 (1999).
- Lombardi, M. S. et al. Oxidative stress decreases G protein-coupled receptor kinase 2 in lymphocytes via a calpain-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 62, 379-88 (2002).
- Lorenz, K., Lohse, M. J. & Quitterer, U. Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2. *Nature* 426, 574-9 (2003).
- Loudon, R. P. & Benovic, J. L. Expression, purification, and characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK6. *J Biol Chem* 269, 22691-7 (1994).
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-75 (1951).
- Lum, L. et al. Hedgehog signal transduction via Smoothed association with a cytoplasmic complex scaffolded by the atypical kinesin, Costal-2. *Mol Cell* 12, 1261-74 (2003).
- Lum, L. & Beachy, P. A. The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *Science* 304, 1755-9 (2004).
- Luo, J. & Benovic, J. L. G protein-coupled receptor kinase interaction with Hsp90 mediates kinase maturation. *J Biol Chem* 278, 50908-14 (2003).
- Lusin, J. D., Vanarotti, M., Li, C., Valiveti, A. & Ames, J. B. NMR structure of DREAM: Implications for Ca(2+)-dependent DNA binding and protein dimerization. *Biochemistry* 47, 2252-64 (2008).
- Lyubarsky, A. L., Chen, C., Simon, M. I. & Pugh, E. N., Jr. Mice lacking G-protein receptor kinase 1 have profoundly slowed recovery of cone-driven retinal responses. *J Neurosci* 20, 2209-17 (2000).
- Ma**, D. et al. Diverse trafficking patterns due to multiple traffic motifs in G protein-activated inwardly rectifying potassium channels from brain and heart. *Neuron* 33, 715-29 (2002).
- Machold, R. et al. Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches.

## BIBLIOGRAFÍA

---

Neuron 39, 937-50 (2003).

Malin, S. A. & Nerbonne, J. M. Elimination of the fast transient in superior cervical ganglion neurons with expression of KV4.2W362F: molecular dissection of IA. *J Neurosci* 20, 5191-9 (2000).

Marambaud, P., Anclio, K., Lopez-Perez, E. & Checler, F. Proteasome inhibitors prevent the degradation of familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 and potentiate A beta 42 recovery from human cells. *Mol Med* 4, 147-57 (1998).

Marambaud, P. et al. A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. *Cell* 114, 635-45 (2003).

Mariggio, S. et al. Tyrosine phosphorylation of G-protein-coupled-receptor kinase 2 (GRK2) by c-Src modulates its interaction with Galphaq. *Cell Signal* 18, 2004-12 (2006).

Mastrangelo, P. et al. Dissociated phenotypes in presenilin transgenic mice define functionally distinct gamma-secretases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8972-7 (2005).

Matkovich, S. J. et al. Cardiac-specific ablation of G-protein receptor kinase 2 redefines its roles in heart development and beta-adrenergic signaling. *Circ Res* 99, 996-1003 (2006).

Matsuda, M., Yamamoto, T. A. & Hirata, M. Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of calcitonin gene expression by the transcriptional repressor DREAM. *Endocrinology* 147, 4608-17 (2006).

Matthews, H. R. The application of Cerenkov counting to column chromatography of <sup>32</sup>P labelled substances. *J Chromatogr* 36, 302-8 (1968).

May, P., Reddy, Y. K. & Herz, J. Proteolytic processing of low density lipoprotein receptor-related protein mediates regulated release of its intracellular domain. *J Biol Chem* 277, 18736-43 (2002).

Maye, P. et al. Hedgehog signaling is required for the differentiation of ES cells into neurectoderm. *Dev Biol* 265, 276-90 (2004).

Mayor, F., Jr., Jurado-Pueyo, M., Campos, P. M. & Murga, C. Interfering with MAP kinase docking interactions: implications and perspective for the p38 route. *Cell Cycle* 6, 528-33 (2007).

McMahon, A. P., Ingham, P. W. & Tabin, C. J. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol* 53, 1-114 (2003).

Medina, M. & Dotti, C. G. RIPped out by presenilin-dependent gamma-secretase. *Cell Signal* 15, 829-41 (2003).

Mellstrom, B. & Naranjo, J. R. Ca<sup>2+</sup>-dependent transcriptional repression and derepression: DREAM, a direct effector. *Semin Cell Dev Biol* 12, 59-63 (2001).

Meloni, A. R. et al. Smoothed signal transduction is promoted by G protein-coupled receptor kinase 2. *Mol Cell Biol* 26, 7550-60 (2006).

- Methot, N. & Basler, K. Hedgehog controls limb development by regulating the activities of distinct transcriptional activator and repressor forms of *Cubitus interruptus*. *Cell* 96, 819-31 (1999).
- Micchelli, C. A., The, I., Selva, E., Mogila, V. & Perrimon, N. Rasp, a putative transmembrane acyltransferase, is required for Hedgehog signaling. *Development* 129, 843-51 (2002).
- Michaud, E. J. & Yoder, B. K. The primary cilium in cell signaling and cancer. *Cancer Res* 66, 6463-7 (2006).
- Milan, M. & Cohen, S. M. Subdividing cell populations in the developing limbs of *Drosophila*: do wing veins and leg segments define units of growth control? *Dev Biol* 217, 1-9 (2000).
- Morata, G. & Lawrence, P. A. Control of compartment development by the engrailed gene in *Drosophila*. *Nature* 255, 614-7 (1975).
- Morfini, G., Szebenyi, G., Elluru, R., Ratner, N. & Brady, S. T. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility. *Embo J* 21, 281-93 (2002).
- Morohashi, Y. et al. Molecular cloning and characterization of CALP/KChIP4, a novel EF-hand protein interacting with presenilin 2 and voltage-gated potassium channel subunit Kv4. *J Biol Chem* 277, 14965-75 (2002).
- Murga, C. et al. High affinity binding of beta-adrenergic receptor kinase to microsomal membranes. Modulation of the activity of bound kinase by heterotrimeric G protein activation. *J Biol Chem* 271, 985-94 (1996).
- N**aga Prasad, S. V., Barak, L. S., Rapacciuolo, A., Caron, M. G. & Rockman, H. A. Agonist-dependent recruitment of phosphoinositide 3-kinase to the membrane by beta-adrenergic receptor kinase 1. A role in receptor sequestration. *J Biol Chem* 276, 18953-9 (2001).
- Nakano, Y. et al. Functional domains and sub-cellular distribution of the Hedgehog transducing protein *Smoothed* in *Drosophila*. *Mech Dev* 121, 507-18 (2004).
- Ni, Y. et al. Activation of beta2-adrenergic receptor stimulates gamma-secretase activity and accelerates amyloid plaque formation. *Nat Med* 12, 1390-6 (2006).
- Niimura, M. et al. Aph-1 contributes to the stabilization and trafficking of the gamma-secretase complex through mechanisms involving intermolecular and intramolecular interactions. *J Biol Chem* 280, 12967-75 (2005).
- Nusse, R. Wnts and Hedgehogs: lipid-modified proteins and similarities in signaling mechanisms at the cell surface. *Development* 130, 5297-305 (2003).
- Nüsslein-Volhard, C. & Wieschaus, E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801 (1980).
- Nybakken, K. E., Turck, C. W., Robbins, D. J. & Bishop, J. M. Hedgehog-stimulated phosphorylation of the kinesin-related protein *Costal2* is mediated by the serine/threonine kinase *fused*. *J Biol Chem* 277, 24638-47 (2002).

## BIBLIOGRAFÍA

---

**O**brenovich, M. E. et al. Insights into Cerebrovascular Complications and Alzheimer Disease Through the Selective Loss of GRK2 Regulation. *J Cell Mol Med* (2008).

Ogden, S. K. et al. Identification of a functional interaction between the transmembrane protein Smoothed and the kinesin-related protein Costal2. *Curr Biol* 13, 1998-2003 (2003).

Ogden, S. K. et al. G protein Galpha(i) functions immediately downstream of Smoothed in Hedgehog signalling. *Nature* (2008).

Oh, Y. S. & Turner, R. J. Evidence that the COOH terminus of human presenilin 1 is located in extracytoplasmic space. *Am J Physiol Cell Physiol* 289, C576-81 (2005).

Oh, Y. S. & Turner, R. J. Topology of the C-terminal fragment of human presenilin 1. *Biochemistry* 44, 11821-8 (2005).

Okamoto, I. et al. Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway. *J Cell Biol* 155, 755-62 (2001).

Orrenius, S., Zhivotovsky, B. & Nicotera, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 552-65 (2003).

**P**alacino, J. J. et al. Regulation of amyloid precursor protein processing by presenilin 1 (PS1) and PS2 in PS1 knockout cells. *J Biol Chem* 275, 215-22 (2000).

Palma, V. & Ruiz i Altaba, A. Hedgehog-Gli signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. *Development* 131, 337-45 (2004).

Pardossi-Piquard, R. et al. Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron* 46, 541-54 (2005).

Parks, A. L. & Curtis, D. Presenilin diversifies its portfolio. *Trends Genet* 23, 140-50 (2007).

Pasca di Magliano, M. & Hebrok, M. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer* 3, 903-11 (2003).

Passer, B. J., Pellegrini, L., Vito, P., Ganjei, J. K. & D'Adamio, L. Interaction of Alzheimer's presenilin-1 and presenilin-2 with Bcl-X(L). A potential role in modulating the threshold of cell death. *J Biol Chem* 274, 24007-13 (1999).

Pasternak, S. H., Callahan, J. W. & Mahuran, D. J. The role of the endosomal/lysosomal system in amyloid-beta production and the pathophysiology of Alzheimer's disease: reexamining the spatial paradox from a lysosomal perspective. *J Alzheimers Dis* 6, 53-65 (2004).

Penela, P., Elorza, A., Sarnago, S. & Mayor, F., Jr. Beta-arrestin- and c-Src-dependent degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *Embo J* 20, 5129-38 (2001).

Penela, P., Ribas, C. & Mayor, F., Jr. Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled

receptor kinases. *Cell Signal* 15, 973-81 (2003).

Penela, P. et al. Mechanisms of regulation of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 69, 46-56 (2006).

Penela, P. et al. G protein-coupled receptor kinase 2 positively regulates epithelial cell migration. *Embo J* 27, 1206-18 (2008).

Penn, R. B. & Benovic, J. L. Structure of the human gene encoding the beta-adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* 269, 14924-30 (1994).

Penn, R. B., Pronin, A. N. & Benovic, J. L. Regulation of G protein-coupled receptor kinases. *Trends Cardiovasc Med* 10, 81-9 (2000).

Peppel, K et al. G protein-coupled receptor kinase 3 (GRK3) gene disruption leads to loss of odorant receptor desensitization. *J Biol Chem* 272, 25425-8 (1997).

Peregrin, S. et al. Phosphorylation of p38 by GRK2 at the docking groove unveils a novel mechanism for inactivating p38MAPK. *Curr Biol* 16, 2042-7 (2006).

Philipp, M. et al. Smoothed signaling in vertebrates is facilitated by a G protein-coupled receptor kinase. *Mol Biol Cell* 19, 5478-89 (2008).

Pierce, K. L. & Lefkowitz, R. J. Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Neurosci* 2, 727-33 (2001).

Pierce, K. L., Premont, R. T. & Lefkowitz, R. J. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 639-50 (2002).

Ping, P., Anzai, T., Gao, M. & Hammond, H. K. Adenylyl cyclase and G protein receptor kinase expression during development of heart failure. *Am J Physiol* 273, H707-17 (1997).

Pitcher, J. A. et al. Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science* 257, 1264-7 (1992).

Pitcher, J. A., Touhara, K., Payne, E. S. & Lefkowitz, R. J. Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the beta-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with G beta gamma subunits and lipid. *J Biol Chem* 270, 11707-10 (1995).

Pitcher, J. A. et al. Feedback inhibition of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) activity by extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem* 274, 34531-4 (1999).

Pitcher, J. A., Freedman, N. J. & Lefkowitz, R. J. G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* 67, 653-92 (1998).

Podos, S. D. & Ferguson, E. L. Morphogen gradients: new insights from DPP. *Trends Genet* 15, 396-402 (1999).

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Popescu, B. O. & Ankarcrona, M. Mechanisms of cell death in Alzheimer's disease: role of presenilins. *J Alzheimers Dis* 6, 123-8 (2004).
- Prager, K. et al. A structural switch of presenilin 1 by glycogen synthase kinase 3 $\beta$ -mediated phosphorylation regulates the interaction with beta-catenin and its nuclear signaling. *J Biol Chem* 282, 14083-93 (2007).
- Premont, R. T., Inglese, J. & Lefkowitz, R. J. Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *Faseb J* 9, 175-82 (1995).
- Premont, R. T. et al. beta2-Adrenergic receptor regulation by GIT1, a G protein-coupled receptor kinase-associated ADP ribosylation factor GTPase-activating protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14082-7 (1998).
- Premont, R. T. & Gainetdinov, R. R. Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol* 69, 511-34 (2007).
- Prokop, S., Shirotani, K., Edbauer, D., Haass, C. & Steiner, H. Requirement of PEN-2 for stabilization of the presenilin N-/C-terminal fragment heterodimer within the gamma-secretase complex. *J Biol Chem* 279, 23255-61 (2004).
- Pronin, A. N., Satpaev, D. K., Slepak, V. Z. & Benovic, J. L. Regulation of G protein-coupled receptor kinases by calmodulin and localization of the calmodulin binding domain. *J Biol Chem* 272, 18273-80 (1997).
- Pronin, A. N., Carman, C. V. & Benovic, J. L. Structure-function analysis of G protein-coupled receptor kinase-5. Role of the carboxyl terminus in kinase regulation. *J Biol Chem* 273, 31510-8 (1998).
- Pronin, A. N., Morris, A. J., Surguchov, A. & Benovic, J. L. Synucleins are a novel class of substrates for G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem* 275, 26515-22 (2000).
- Prossnitz, E. R. Novel roles for arrestins in the post-endocytic trafficking of G protein-coupled receptors. *Life Sci* 75, 893-9 (2004).
- Ramos-Ruiz, R., Penela, P., Penn, R. B. & Mayor, F., Jr. Analysis of the human G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) gene promoter: regulation by signal transduction systems in aortic smooth muscle cells. *Circulation* 101, 2083-9 (2000).
- Ratovitski, T. et al. Endoproteolytic processing and stabilization of wild-type and mutant presenilin. *J Biol Chem* 272, 24536-41 (1997).
- Reiter, E. & Lefkowitz, R. J. GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab* 17, 159-65 (2006).
- Ribas, C. et al. The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochim Biophys Acta* 1768, 913-22 (2007).
- Riobo, N. A., Saucy, B., Dilizio, C. & Manning, D. R. Activation of heterotrimeric G proteins by Smoothed. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12607-12 (2006).



- Rivas, M., Mellstrom, B., Naranjo, J. R. & Santisteban, P. Transcriptional repressor DREAM interacts with thyroid transcription factor-1 and regulates thyroglobulin gene expression. *J Biol Chem* 279, 33114-22 (2004).
- Roepstorff, P. & Fohlman, J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom* 11, 601 (1984).
- Rohatgi, R., Milenkovic, L. & Scott, M. P. Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* 317, 372-6 (2007).
- Rohatgi, R. & Scott, M. P. Cell biology. Arrestin' movement in cilia. *Science* 320, 1726-7 (2008).
- Ruel, L., Rodriguez, R., Gallet, A., Lavenant-Staccini, L. & Therond, P. P. Stability and association of Smoothed, Costal2 and Fused with Cubitus interruptus are regulated by Hedgehog. *Nat Cell Biol* 5, 907-13 (2003).
- Ruiz-Gomez, A. & Mayor, F., Jr. Beta-adrenergic receptor kinase (GRK2) colocalizes with beta-adrenergic receptors during agonist-induced receptor internalization. *J Biol Chem* 272, 9601-4 (1997).
- Ruiz-Gomez, A. et al. Phosphorylation of phosducin and phosducin-like protein by G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem* 275, 29724-30 (2000).
- Ruiz-Gomez, A. et al. G protein-coupled receptor kinase 2-mediated phosphorylation of downstream regulatory element antagonist modulator regulates membrane trafficking of Kv4.2 potassium channel. *J Biol Chem* 282, 1205-15 (2007).
- Ruiz-Gomez, A., Molnar, C., Holguin, H., Mayor, F., Jr. & de Celis, J. F. The cell biology of Smo signalling and its relationships with GPCRs. *Biochim Biophys Acta* 1768, 901-12 (2007).
- Ruiz-Gomez, M. & Ghysen, A. The expression and role of a proneural gene, achaete, in the development of the larval nervous system of *Drosophila*. *Embo J* 12, 1121-30 (1993).
- S**adowski, I. et al. GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* 335, 563-4 (1988).
- Salcedo**, A., Mayor, F., Jr. & Penela, P. Mdm2 is involved in the ubiquitination and degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *Embo J* 25, 4752-62 (2006).
- Saleh, M. C. et al. The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. *Nat Cell Biol* 8, 793-802 (2006).
- Sallese, M. et al. G protein-coupled receptor kinase GRK4. Molecular analysis of the four isoforms and ultrastructural localization in spermatozoa and germinal cells. *J Biol Chem* 272, 10188-95 (1997).
- Sallese, M. et al. Regulation of G protein-coupled receptor kinase subtypes by calcium sensor proteins. *Biochim Biophys Acta* 1498, 112-21 (2000).
- Sallese, M., Mariggio, S., D'Urbano, E., Iacovelli, L. & De Blasi, A. Selective regulation of Gq signaling by G protein-

## BIBLIOGRAFÍA

---

coupled receptor kinase 2: direct interaction of kinase N terminus with activated galphaq. *Mol Pharmacol* 57, 826-31 (2000).

Sanchez-Perez, A., Kumar, S. & Cook, D. I. GRK2 interacts with and phosphorylates Nedd4 and Nedd4-2. *Biochem Biophys Res Commun* 359, 611-5 (2007).

Sanz, C., Mellstrom, B., Link, W. A., Naranjo, J. R. & Fernandez-Luna, J. L. Interleukin 3-dependent activation of DREAM is involved in transcriptional silencing of the apoptotic Hrk gene in hematopoietic progenitor cells. *Embo J* 20, 2286-92 (2001).

Sarnago, S., Elorza, A. & Mayor, F., Jr. Agonist-dependent phosphorylation of the G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) by Src tyrosine kinase. *J Biol Chem* 274, 34411-6 (1999).

Sato, T. et al. Active gamma-secretase complexes contain only one of each component. *J Biol Chem* 282, 33985-93 (2007).

Scheper, W., Zwart, R. & Baas, F. Rab6 membrane association is dependent of Presenilin 1 and cellular phosphorylation events. *Brain Res Mol Brain Res* 122, 17-23 (2004).

Schneider, L. E. & Spradling, A. C. The Drosophila G-protein-coupled receptor kinase homologue Gprk2 is required for egg morphogenesis. *Development* 124, 2591-602 (1997).

Schrader, L. A., Anderson, A. E., Mayne, A., Pfaffinger, P. J. & Sweatt, J. D. PKA modulation of Kv4.2-encoded A-type potassium channels requires formation of a supramolecular complex. *J Neurosci* 22, 10123-33 (2002).

Schrader, L. A. et al. ERK/MAPK regulates the Kv4.2 potassium channel by direct phosphorylation of the pore-forming subunit. *Am J Physiol Cell Physiol* 290, C852-61 (2006).

Schulz, R., Wehmeyer, A. & Schulz, K. Opioid receptor types selectively cointernalize with G protein-coupled receptor kinases 2 and 3. *J Pharmacol Exp Ther* 300, 376-84 (2002).

Seeger, M. et al. Evidence for phosphorylation and oligomeric assembly of presenilin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5090-4 (1997).

Sefton, M., Blanco, M. J., Penela, P., Mayor, F. & Nieto, M. A. Expression of the G protein-coupled receptor kinase 2 during early mouse embryogenesis. *Mech Dev* 98, 127-31 (2000).

Selkoe, D. & Kopan, R. Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci* 26, 565-97 (2003).

Selkoe, D. J. & Wolfe, M. S. Presenilin: running with scissors in the membrane. *Cell* 131, 215-21 (2007).

Shah, S. et al. Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell* 122, 435-47 (2005).

Shibasaki, F., Hallin, U. & Uchino, H. Calcineurin as a multifunctional regulator. *J Biochem* 131, 1-15 (2002).

- Shibata, R. et al. A fundamental role for KChIPs in determining the molecular properties and trafficking of Kv4.2 potassium channels. *J Biol Chem* 278, 36445-54 (2003).
- Shichi, H. & Somers, R. L. Light-dependent phosphorylation of rhodopsin. Purification and properties of rhodopsin kinase. *J Biol Chem* 253, 7040-6 (1978).
- Shiina, T. et al. Clathrin box in G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem* 276, 33019-26 (2001).
- Shirotani, K., Edbauer, D., Prokop, S., Haass, C. & Steiner, H. Identification of distinct gamma-secretase complexes with different APH-1 variants. *J Biol Chem* 279, 41340-5 (2004).
- Smelkinson, M. G. & Kalderon, D. Processing of the Drosophila hedgehog signaling effector Ci-155 to the repressor Ci-75 is mediated by direct binding to the SCF component Slimb. *Curr Biol* 16, 110-6 (2006).
- Spasic, D. et al. Presenilin-1 maintains a nine-transmembrane topology throughout the secretory pathway. *J Biol Chem* 281, 26569-77 (2006).
- Spasic, D. et al. Rer1p competes with APH-1 for binding to nicastrin and regulates gamma-secretase complex assembly in the early secretory pathway. *J Cell Biol* 176, 629-40 (2007).
- Stegman, M. A. et al. Identification of a tetrameric hedgehog signaling complex. *J Biol Chem* 275, 21809-12 (2000).
- Stegman, M. A. et al. The Kinesin-related protein Costal2 associates with membranes in a Hedgehog-sensitive, Smoothened-independent manner. *J Biol Chem* 279, 7064-71 (2004).
- Steiner, H. et al. Expression of Alzheimer's disease-associated presenilin-1 is controlled by proteolytic degradation and complex formation. *J Biol Chem* 273, 32322-31 (1998).
- Sterne-Marr, R. et al. G protein-coupled receptor Kinase 2/G alpha q/11 interaction. A novel surface on a regulator of G protein signaling homology domain for binding G alpha subunits. *J Biol Chem* 278, 6050-8 (2003).
- Stone, D. M. et al. The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* 384, 129-34 (1996).
- Strang, C., Kunjilwar, K., DeRubeis, D., Peterson, D. & Pfaffinger, P. J. The role of Zn<sup>2+</sup> in Shal voltage-gated potassium channel formation. *J Biol Chem* 278, 31361-71 (2003).
- Stromberg, K. et al. gamma-Secretase complexes containing N- and C-terminal fragments of different presenilin origin retain normal gamma-secretase activity. *J Neurochem* 95, 880-90 (2005).
- Suo, Z., Wu, M., Citron, B. A., Wong, G. T. & Festoff, B. W. Abnormality of G-protein-coupled receptor kinases at prodromal and early stages of Alzheimer's disease: an association with early beta-amyloid accumulation. *J Neurosci* 24, 3444-52 (2004).
- Tabata, T., Eaton, S. & Kornberg, T. B. The Drosophila hedgehog gene is expressed specifically in posterior

## BIBLIOGRAFÍA

---

compartment cells and is a target of engrailed regulation. *Genes Dev* 6, 2635-45 (1992).

Tabata, T. & Takei, Y. Morphogens, their identification and regulation. *Development* 131, 703-12 (2004).

Takasugi, N. et al. The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature* 422, 438-41 (2003).

Takimoto, K. & Ren, X. KChIPs (Kv channel-interacting proteins)--a few surprises and another. *J Physiol* 545, 3 (2002).

Taniguchi, Y., Kim, S. H. & Sisodia, S. S. Presenilin-dependent "gamma-secretase" processing of deleted in colorectal cancer (DCC). *J Biol Chem* 278, 30425-8 (2003).

Tautz, D. & Pfeifle, C. A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* 98, 81-5 (1989).

Terwilliger, R. Z., Ortiz, J., Guitart, X. & Nestler, E. J. Chronic morphine administration increases beta-adrenergic receptor kinase (beta ARK) levels in the rat locus coeruleus. *J Neurochem* 63, 1983-6 (1994).

Thinakaran, G. et al. Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* 17, 181-90 (1996).

Thinakaran, G. et al. Evidence that levels of presenilins (PS1 and PS2) are coordinately regulated by competition for limiting cellular factors. *J Biol Chem* 272, 28415-22 (1997).

Torroja, C., Gorfinkiel, N. & Guerrero, I. Patched controls the Hedgehog gradient by endocytosis in a dynamin-dependent manner, but this internalization does not play a major role in signal transduction. *Development* 131, 2395-408 (2004).

Torroja, C., Gorfinkiel, N. & Guerrero, I. Mechanisms of Hedgehog gradient formation and interpretation. *J Neurobiol* 64, 334-56 (2005).

Touhara, K., Koch, W. J., Hawes, B. E. & Lefkowitz, R. J. Mutational analysis of the pleckstrin homology domain of the beta-adrenergic receptor kinase. Differential effects on G beta gamma and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding. *J Biol Chem* 270, 17000-5 (1995).

Uemura, K. et al. GSK3beta activity modifies the localization and function of presenilin 1. *J Biol Chem* 282, 15823-32 (2007).

Ungerer, M. et al. Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* 87, 454-63 (1993).

Ungerer, M. et al. Expression of beta-arrestins and beta-adrenergic receptor kinases in the failing human heart. *Circ Res* 74, 206-13 (1994).

Ungerer, M., Hartmann, F. & Richardt, G. [The sympathetic-adrenergic system in heart failure]. *Dtsch Med Wochenschr* 121, 141-5 (1996).

Usui, I. et al. G protein-coupled receptor kinase 2 mediates endothelin-1-induced insulin resistance via the inhibition of both Galphaq/11 and insulin receptor substrate-1 pathways in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 19, 2760-8 (2005).

**V**an Gassen, G., Annaert, W. & Van Broeckhoven, C. Binding partners of Alzheimer's disease proteins: are they physiologically relevant? *Neurobiol Dis* 7, 135-51 (2000).

Vervoort, M. hedgehog and wing development in *Drosophila*: a morphogen at work? *Bioessays* 22, 460-8 (2000).

Vetrivel, K. S., Zhang, Y. W., Xu, H. & Thinakaran, G. Pathological and physiological functions of presenilins. *Mol Neurodegener* 1, 4 (2006).

Vinge, L. E. et al. Myocardial distribution and regulation of GRK and beta-arrestin isoforms in congestive heart failure in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281, H2490-9 (2001).

Virlon, B. et al. Rat G protein-coupled receptor kinase GRK4: identification, functional expression, and differential tissue distribution of two splice variants. *Endocrinology* 139, 2784-95 (1998).

Vito, P. et al. Requirement of the familial Alzheimer's disease gene PS2 for apoptosis. Opposing effect of ALG-3. *J Biol Chem* 271, 31025-8 (1996).

Vroon, A. et al. Reduced GRK2 level in T cells potentiates chemotaxis and signaling in response to CCL4. *J Leukoc Biol* 75, 901-9 (2004).

Vroon, A. et al. G protein-coupled receptor kinase 2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 174, 4400-6 (2005).

**W**alker, J. K. et al. G protein-coupled receptor kinase 5 regulates airway responses induced by muscarinic receptor activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286, L312-9 (2004).

Wang, S. H., Simcox, A. & Campbell, G. Dual role for *Drosophila* epidermal growth factor receptor signaling in early wing disc development. *Genes Dev* 14, 2271-6 (2000).

Whalen, E. J. et al. Regulation of beta-adrenergic receptor signaling by S-nitrosylation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *Cell* 129, 511-22 (2007).

Wilbanks, A. M. et al. Beta-arrestin 2 regulates zebrafish development through the hedgehog signaling pathway. *Science* 306, 2264-7 (2004).

Wilden, U. & Kuhn, H. Light-dependent phosphorylation of rhodopsin: number of phosphorylation sites. *Biochemistry* 21, 3014-22 (1982).

Willems, J. M., Challiss, R. A. & Nahorski, S. R. Non-visual GRKs: are we seeing the whole picture? *Trends Pharmacol Sci* 24, 626-33 (2003).

## BIBLIOGRAFÍA

---

Wiltfang, J. et al. Improved electrophoretic separation and immunoblotting of beta-amyloid (A beta) peptides 1-40, 1-42, and 1-43. *Electrophoresis* 18, 527-32 (1997).

Winstel, R., Freund, S., Krasel, C., Hoppe, E. & Lohse, M. J. Protein kinase cross-talk: membrane targeting of the beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2105-9 (1996).

Wolfe, M. S. & Kopan, R. Intramembrane proteolysis: theme and variations. *Science* 305, 1119-23 (2004).

Wolozin, B. et al. Participation of presenilin 2 in apoptosis: enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation. *Science* 274, 1710-3 (1996).

Xu, Y. et al. Intracellular domains of amyloid precursor-like protein 2 interact with CP2 transcription factor in the nucleus and induce glycogen synthase kinase-3beta expression. *Cell Death Differ* 14, 79-91 (2007).

Yang, D. S. et al. Mature glycosylation and trafficking of nicastrin modulate its binding to presenilins. *J Biol Chem* 277, 28135-42 (2002).

Yi, X. P., Gerdes, A. M. & Li, F. Myocyte redistribution of GRK2 and GRK5 in hypertensive, heart-failure-prone rats. *Hypertension* 39, 1058-63 (2002).

Yu, G. et al. The presenilin 1 protein is a component of a high molecular weight intracellular complex that contains beta-catenin. *J Biol Chem* 273, 16470-5 (1998).

Yu, G. et al. Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* 407, 48-54 (2000).

Zaidi, N. F. et al. Biochemical and immunocytochemical characterization of calsenilin in mouse brain. *Neuroscience* 114, 247-63 (2002).

Zecca, M. & Struhl, G. Control of growth and patterning of the Drosophila wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. *Development* 129, 1369-76 (2002).

Zecca, M. & Struhl, G. Subdivision of the Drosophila wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. *Development* 129, 1357-68 (2002).

Zeng, X. et al. A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling. *Nature* 411, 716-20 (2001).

Zhang, C., Williams, E. H., Guo, Y., Lum, L. & Beachy, P. A. Extensive phosphorylation of Smoothened in Hedgehog pathway activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17900-7 (2004).

Zhao, X., Palczewski, K. & Ohguro, H. Mechanism of rhodopsin phosphorylation. *Biophys Chem* 56, 183-8 (1995).

Zhao, Y., Tong, C. & Jiang, J. Hedgehog regulates smoothened activity by inducing a conformational switch. *Nature* 450, 252-8 (2007).